

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

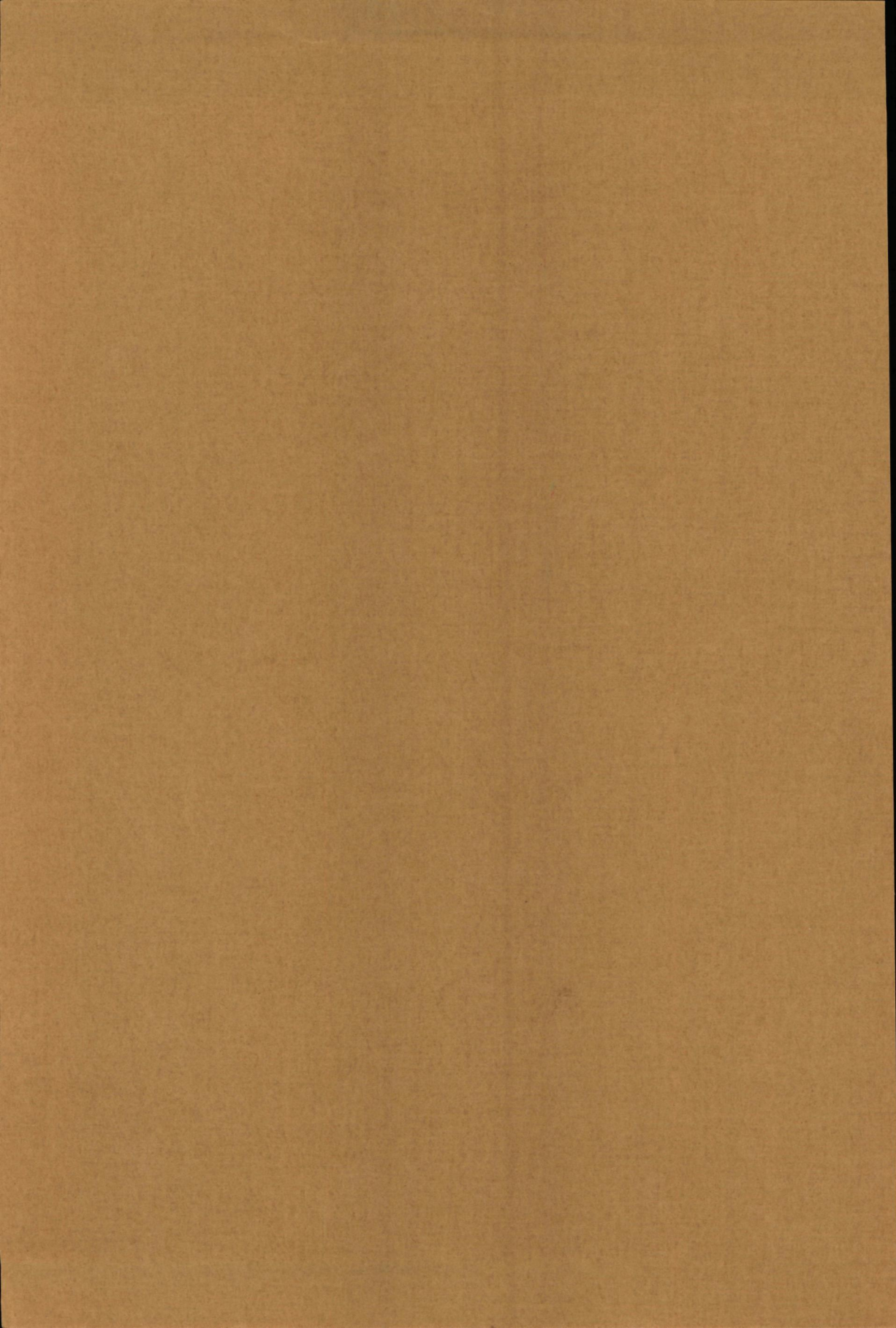
<http://hdl.handle.net/2066/107418>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

1423

ENZYMATISCHE ASPECTEN
VAN HET
KATIONENTRANSPORT IN
ESCHERICHIA COLI

J. C. M. HAFKENSCHIED



**ENZYMATISCHE ASPECTEN VAN HET
KATIONENTRANSPORT IN ESCHERICHIA COLI**

PROMOTOR:
PROF. DR. S. L. BONTING

ENZYMATISCHE ASPECTEN VAN HET KATIONENTRANSPORT IN ESCHERICHIA COLI

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN DE
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN, OP GEZAG
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS MR. S. F. L. BARON VAN WIJNBERGEN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEITEN DER RECHTSGELEERDHEID
EN DER SOCIALE WETENSCHAPPEN,
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT IN HET OPENBAAR
TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 14 FEBRUARI 1969,
DES NAMIDDAGS TE 2 UUR

DOOR

JOANNES CONSTANTIUS MARIA HAFKENSCHIED

GEBOREN TE AMSTERDAM

1969

DRUKKERIJ GEBR. JANSSEN N.V. NIJMEGEN

Ter nagedachtenis aan mijn vader
Aan mijn moeder

De vele stimulerende discussies met Dr. J. A. J. M. Bakkeren heb ik bijzonder op prijs gesteld. De steun en interesse van Dr. Chr. van der Drift en Dr. J. M. F. Trijbels heb ik zeer gewaardeerd. Ik ben vooral Mej. C. Th. M. Beunen veel dank verschuldigd voor de toegewijde hulp en de prettige samenwerking tijdens het gehele promotieonderzoek.

De tekeningen van dit proefschrift werden vervaardigd door de Heer W. P. J. Maas van de Medische Tekenkamer (Hoofd Chr. van Huijzen) en het fotografische gedeelte werd verzorgd door de afdeling Medische Fotografie (Hoofd A. Reijnen).

INHOUD

AFKORTINGEN

XI

HOOFDSTUK I

HUIDIG INZICHT IN HET TRANSPORTMECHANISME VAN KATIONEN

I.1	Inleiding	I
I.2	Transport via membranen	I
I.3	Intracellulair natrium en kalium	3
I.4.1	Voorkomen van (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase	4
I.4.2	Eigenschappen van het (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase systeem	5
I.4.3	Mechanisme van het (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase systeem	7
I.4.4	(Na ⁺ -K ⁺)-ATPase en K ⁺ -afhankelijke phosphatase	9
I.5	Relatie van het (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase systeem tot het actief transport van Na ⁺ en K ⁺ ionen	11
I.6.1	Natrium- en kaliumtransport in <i>Escherichia coli</i>	12
I.6.2	(Na ⁺ -K ⁺)-ATPase in bacteriën	13
I.7	Doelstelling van dit onderzoek	14

HOOFDSTUK II

METHODEN EN MATERIALEN

II.1	Kweken en oogsten van de micro-organismen	15
II.2	Enzymatische bepalingen	16
II.2.1	Bepaling van de (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase activiteit	16
II.2.2	Bepaling van de Mg ²⁺ -ATPase activiteit	17
II.2.3	Bepaling van de zure phosphatase activiteit	18
II.3	Bereiden van een cel-vrij extract voor de zure phosphatase	18
II.4	Bepaling van de ⁸⁶ Rb ⁺ opname	18
II.5	Bepaling van het natrium- en kaliumgehalte	19
II.6	Eiwitbepaling	19
II.7	Bereiding van het Triszout van ATP	20
II.8	Statistische analyse	20
II.9	Materialen	20

VII

HOOFDSTUK III

(Na⁺-K⁺)-ATPASE: AANWEZIGHEID EN ENIGE EIGENSCHAPPEN VAN HET ENZYMSYSTEEM

III.1	Inleiding	22
III.2	Voorbehandeling van bacteriën met ureum	23
III.3	Relatieve ATPase activiteiten in verschillende substraatmedia met of zonder voorbehandeling met ureum	25
III.4	Reactiesnelheid als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd	27
III.5	Mg ²⁺ -activeringscurve	27
III.6	Invloed van K ⁺ ionen op de (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase activiteit	28
III.7	pH Optimum	29
III.8	Substraatspecificiteit	30
III.9	Invloed van monovalente kationen op de (Na ⁺ -K ⁺)-ATPase activiteit	31
III.9.1	Vervanging van K ⁺ ionen door andere monovalente kationen	31
III.9.2	Vervanging van Na ⁺ ionen door andere monovalente kationen	32
III.10	Discussie.	33

HOOFDSTUK IV

EIGENSCHAPPEN VAN EEN Mg²⁺-ATPASE, GESTIMULEERD DOOR MONOVALENTE KATIONEN

IV.1	Inleiding	35
IV.2	Reactiesnelheid van de Mg ²⁺ -ATPase als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd	35
IV.3	pH Optimum	36
IV.4	Invloed van monovalente kationen op de Mg ²⁺ -ATPase	38
IV.5	De invloed van KCl op de Mg ²⁺ -ATPase: stimulering of stabilisering.	39
IV.6	Invloed van anionen op de Mg ²⁺ -ATPase	40
IV.7	Mg ²⁺ -activeringscurve	41
IV.8	Substraatspecificiteit	42
IV.9	Invloed van bivalente kationen op de ATPase	44
IV.10	Reactiesnelheid van de Mg ²⁺ -ATPase als functie van de substraatconcentratie	45
IV.11	Invloed van de temperatuur op en activeringsenergie van de Mg ²⁺ -ATPase	46

IV.12	Invloed van de ionensterkte en van verschillende buffers op de Mg^{2+} -ATPase	49
IV.13	Verdeling van de enzymatische activiteit na soniceren . . .	50
IV.14	Discussie.	51

HOOFDSTUK V

BEPALING VAN DE $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPASE ACTIVITEIT EN VAN DE K/ATP VERHOUDING

V.1	Inleiding	54
V.2	Relatieve ATPase activiteiten in verschillende substraatmedia	54
V.3	Invloed van Na^{+} ionen op de $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase activiteit .	57
V.4	Invloed van K^{+} ionen op de $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase activiteit .	58
V.5	Invloed van erythrophleine en scillareen A op de $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase activiteit	59
V.6	Berekening van de K/ATP verhouding	60
V.7	Discussie.	61

HOOFDSTUK VI

NATRIUM- EN KALIUMGEHALTE

VI.1	Inleiding	64
VI.2	Groei van de bacteriën.	65
VI.3	Bepaling van het natrium- en kaliumgehalte	66
VI.4	Invloed van ouabaine op de groeisnelheid van de bacteriën .	68
VI.5	Discussie.	69

HOOFDSTUK VII

OPNAME VAN $^{86}Rb^{+}$ DOOR INTACTE CELLEN

VII.1	Inleiding	71
VII.2	Opnamesnelheid van $^{86}Rb^{+}$ in afhankelijkheid van het aantal cellen en de incubatietijd	73
VII.3	Invloed van glucose op de $^{86}Rb^{+}$ opname	74
VII.4	Invloed van K^{+} ionen op de $^{86}Rb^{+}$ opname.	74
VII.5	Invloed van Na^{+} ionen en cholinechloride op de $^{86}Rb^{+}$ opname	76
VII.6	Invloed van de pH op de $^{86}Rb^{+}$ opname	77

VII.7	Invloed van ouabaine en andere remstoffen op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname	78
VII.8	Invloed van ouabaine op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname bij pH 5,3	79
VII.9	Efflux van $^{22}\text{Na}^+$	81
VII.10	Discussie.	81

HOOFDSTUK VIII

ZURE PHOSPHATASE: EIGENSCHAPPEN EN RELATIE TOT HET (Na^+ - K^+)-ATPASE SYSTEEM

VIII.1	Inleiding	83
VIII.2	Reactiesnelheid van de zure phosphatase als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd	83
VIII.3	pH Optimum	84
VIII.4	Invloed van monovalente kationen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6	86
VIII.5	Invloed van verschillende anionen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6	87
VIII.6	Invloed van ouabaine op de toename van de phosphatase activiteit bij pH 3,6.	88
VIII.7	Substraatspecificiteit	88
VIII.8	Reactiesnelheid van de zure phosphatase als functie van de substraatconcentratie	90
VIII.9	Relatie van de zure phosphatase tot het (Na^+ - K^+)-ATPase systeem	90
VIII.9.1	(Na^+ - K^+)-ATPase en anion-gestimuleerde phosphatase gedurende de groei van de bacteriën	91
VIII.9.2	Invloed van Mg^{2+} ionen op de (Na^+ - K^+)-ATPase en de anion-gestimuleerde phosphatase	92
VIII.9.3	Invloed van p-nitrophenylphosphaat op de (Na^+ - K^+)-ATPase en van ATP op de anion-gestimuleerde phosphatase	92
VIII.9.4	Enzympatroon na osmotische „shock”	93
VIII.10	Discussie.	94
SAMENVATTING		97
SUMMARY		100
LITERATUUR		103

AFKORTINGEN

ADP	Adenosinediphosfaat
AMP	Adenosinemonophosfaat
AMP-I	2-Amino-2-methylpropanol-1
ATP	Adenosinetriphosfaat
ATPase	Adenosinetriphosphatase
CTP	Cytidinetriphosfaat
DNP	2,4-Dinitrophenol
dpm	desintegraties per minuut
EDTA	Ethyleendiamine-tetra-acetaat
GTP	Guanosinetriphosfaat
ITP	Inosinetriphosfaat
K _m	Michaelis constante
Pi	Anorganisch fosfaat
TCA	Trichloorazijnzuur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan
TTP	Thymidinetriphosfaat
UTP	Uridinetriphosfaat

HOOFDSTUK I

HUIDIG INZICHT IN HET TRANSPORTMECHANISME VAN KATIONEN

I.1 Inleiding

Het is reeds lange tijd bekend, dat er een groot verschil bestaat tussen de kationensamenstelling van de celinhoud en de omringende vloeistof. Cellen zijn over het algemeen rijk aan K^+ ionen en arm aan Na^+ ionen, terwijl het omgekeerde geldt voor de extracellulaire vloeistof. De cel is omgeven door een plasmamembraan, die een algemene barriere vormt voor de passage van water en alle opgeloste stoffen tussen het inwendige van de cel en de omringende vloeistof. Deze celmembranen zijn in staat de grote verschillen tussen beide vloeistofcompartimenten te handhaven. Het spreekt dan ook vanzelf, dat er voor deze grote concentratieverschillen een aanwijsbare oorzaak moet zijn. Enerzijds kan dit probleem benaderd worden door de samenstelling van de celmembraan te bepalen en daardoor na te gaan of de te transporteren stoffen op een bepaalde manier in de membranen opgenomen kunnen worden, anderzijds door het mechanisme van dit transport te bestuderen. Hierbij moet rekening gehouden worden met het feit, dat de totale concentratie van kationen en anionen aan beide zijden van de celmembraan gelijk moet zijn vanwege de electroneutraliteit. Ook spelen osmotische balans en Gibbs-Donnan evenwicht hierbij een rol.

Wij zullen in het kort de diverse transportmogelijkheden bespreken en ons daarna verder beperken tot het transport van Na^+ en K^+ ionen via de celmembraan en het daarmee verbonden systeem, dat de energie hiervoor levert.

I.2 Transport via membranen

Er zijn verschillende mogelijkheden, waarop een stof de celmembraan kan passeren. Hoewel het vaak moeilijk is deze mogelijkheden geheel van elkaar te onderscheiden, omdat de verschillende processen tegelijkertijd werkzaam kunnen zijn, zullen wij ze hier apart vermelden.

1. Vrije diffusie. Bij dit proces is het concentratieverschil aan beide zijden van de membraan de drijvende kracht. Vanwege een aaneengesloten laag van lipiden in de membraan kunnen alleen stoffen met lipophile eigenschappen via dit

proces de celmembraan passeren. Bij deze diffusie kan voorts nog de z.g. volgdiffusie optreden. Om de osmotische gradiënt, die ontstaat na de vrije diffusie, te compenseren zullen watermoleculen in dezelfde richting kunnen volgen of om de electroneutraliteit te handhaven kunnen anionen zich in dezelfde richting of andere kationen zich in tegenovergestelde richting bewegen.

2. Diffusie door poriën. Water en water-oplosbare stoffen kunnen door een concentratiegradiënt gedreven de cel binnen gaan via hypothetische kanaaltjes, poriën, in de membraan.

3. Pinocytose. Hierbij is de cel als gevolg van instulpingen in de celmembraan in staat bepaalde hoeveelheden extracellulaire vloeistof en de daarin opgeloste stoffen op te nemen en naar het celinwendige te brengen. Deze bolletjes manifesteren zich als kleine vacuolen en worden geleidelijk opgelost.

4. Carrier-gebonden diffusie. Het wordt algemeen aanvaard, dat het transport van alle water-oplosbare stoffen, welke te groot zijn om gemakkelijk door poriën te kunnen passeren, een carrier-gebonden transport is. Hierbij moeten de stoffen, die getransporteerd worden tijdelijk vetoplosbaar gemaakt worden om te kunnen passeren. De hypothetische stof, welke deze verandering teweegbrengt, wordt de carrier genoemd. Bij dit carrier-gebonden transport is niet de carrier zelf de drijvende kracht. Hierbij moet onderscheid gemaakt worden tussen het passieve transport en het actieve transport.

Bij het passieve transport bestaat de mogelijkheid van carrier-gebonden transport in één richting („facilitated diffusion”) en van carrier-gebonden transport in één richting, gekoppeld aan het transport van een andere stof in de tegenovergestelde richting („exchange diffusion”). De drijvende kracht in deze gevallen is het concentratieverschil tussen intra- en extracellulaire ruimte.

Bij het actieve transport is er sprake van een carrier-gebonden transport van een stof in één richting, al of niet-gekoppeld aan het transport van een andere stof in de tegenovergestelde richting tegen een chemische of elektrische potentiaal in. Hierbij is energie nodig, welke door het celmetabolisme geleverd moet worden. Bij dit energievragend transport neemt de vrije energie van het substraat toe ten koste van metabolische energie. Er zijn een aantal mogelijkheden gesuggereerd, waarop de cel deze energie zou kunnen leveren. Dit kan geschieden door de energie, welke vrijkomt tijdens overdracht van elektronen in de ademhalingsketen of door mechanische energie, die geleverd wordt door contractie van de membraan of door een elektrisch veld, dat door vrije radicalen veroorzaakt wordt. Een vierde mogelijkheid wordt gevormd door de aanwezigheid van een enzymstelsel, dat ATP hydrolyseert tot ADP en Pi. De hierbij vrijkomende chemische energie kan gebruikt worden als „osmotische” energie voor het transport. Voor het actieve transport van Na^+ en K^+ ionen is in de cel een ATPase aanwezig. Maximale activiteit hiervan wordt verkregen, wan-

neer Na^+ en K^+ ionen tezamen aanwezig zijn; wij spreken dan ook van een (Na^+ - K^+)-geactiveerde ATPase. Skou (1957) ontdekte als eerste dit enzymstelsel in de zenuw van de krab *Carcinus maenas*. In aanwezigheid van Mg^{2+} ionen gaf toevoegen van Na^+ ionen een geringe verhoging; K^+ ionen hadden geen effect. Een belangrijke verhoging van de enzymatische activiteit werd gevonden, wanneer in aanwezigheid van Mg^{2+} en K^+ ionen ook nog Na^+ ionen toegevoegd werden.

Voordat wij het voorkomen, de eigenschappen en het reactiemechanisme nader beschrijven, zullen wij eerst ingaan op de verhouding van Na^+ en K^+ ionen aan beide zijden van de celmembraan.

I.3 Intracellulair natrium en kalium

In het algemeen bevatten cellen een hoog kalium- en een laag natriumgehalte, terwijl de extracellulaire vloeistof juist een laag kalium- en een hoog natriumgehalte bevat. Menselijke erythrocyten b.v. bevatten 20 meq natrium en 130 meq kalium per l celwater, terwijl het plasma 140 meq natrium en 4 meq kalium per l bevat. Het spreekt dan ook vanzelf, dat door dit concentratieverschil kalium de cel uitlekt en natrium de cel inlekt. Dit is het z.g. passieve transport van deze ionen, waarvoor geen energie vereist is. Om het concentratieverschil echter te handhaven moet kalium tegen de gradiënt naar binnen en natrium naar buiten gepompt worden. Dit is het actieve kationentransport.

Deze verdelingsverhouding van de beide ionen in de intracellulaire en extracellulaire vloeistof zou ook tot stand kunnen komen zonder dat er sprake is van een actief transport. Hierbij wordt er vanuit gegaan, dat de ionen gebonden worden door cellulaire bestanddelen. Argumenten daartegen zijn, dat de ionen zich vrij in het cytoplasma kunnen bewegen, dat zij osmotisch volledig actief zijn en dat de cel te weinig bestanddelen bevat met bindingscapaciteit om alle ionen te binden. Tegenwoordig wordt algemeen aanvaard, dat er een pompmechanisme in de cel aanwezig is.

Vele experimenten over het ionentransport zijn uitgevoerd met erythrocyten, omdat deze vergeleken met weefselcellen zo gemakkelijk van de omringende vloeistof gescheiden kunnen worden. Schatzman (1953) vond als eerste, dat in aanwezigheid van hartglycosiden, zoals ouabaine, het intracellulaire kaliumgehalte verlaagd en het intracellulaire natriumgehalte verhoogd werd. Door incubatie bij lage temperatuur werd duidelijk, dat ouabaine invloed had op het actief transport en niet op een verhoogde snelheid van de passieve terugresorptie van de getransporteerde ionen. Deze remming van het kationentransport door ouabaine is daarna aangetoond in vele weefsels, waarin een actief transport van deze kationen aanwezig is b.v. de sartorius spier van de kikker (Johnson, 1956;

Edwards en Harris, 1957), ascites tumor cellen (Maizels c.s., 1958), nier (Orloff en Burg, 1960), reuze-axon van de pijl-inktvis (Caldwell en Keynes, 1959) en corpus ciliare van het menselijk oog (Simon en Bonting, 1962; Bonting en Becker, 1964).

Dit actief transport, dat door ouabaine geremd kan worden, verkrijgt zijn energie van ATP. Gardos (1954) toonde aan, dat er in „ghosts” van erythrocyten een correlatie bestaat tussen de actieve opname van K^+ ionen en de afbraak van ATP. In intacte erythrocyten constateerde Whittam (1958), dat in afwezigheid van glucose de snelheid, waarmede de opname van K^+ ionen afnam, parallel verliep aan de vermindering van de concentratie van ATP. Wanneer echter ditzelfde experiment uitgevoerd werd met erythrocyten met een actief glycolysesysteem, dan bleef zowel de opname van K^+ ionen als de concentratie van ATP constant. Als nu in afwezigheid van glucose aan erythrocyten ouabaine toegevoegd werd, nam de K^+ opname af, maar deze ging vergezeld van een vermindering in de afbraak van ATP in deze cellen. In aanwezigheid van glucose verminderde door toevoegen van ouabaine wel de K^+ opname, maar niet de concentratie van ATP, zodat hieruit geconcludeerd kan worden, dat ouabaine het transport van de ionen niet remt door de synthese van ATP te blokkeren (Whittam, 1958). Ook met behulp van de schede van de reuze-axon van de pijl-inktvis is men er in geslaagd aan te tonen, dat er een direct verband bestaat tussen het actieve transport van de beide kationen en een chemische reactie (Keynes, 1961). De afgifte van Na^+ ionen verminderde in cellen, waarin het metabolisme geremd werd door toevoegen van DNP of cyanide. Door een micro-injectie van ATP in de cel kon deze afgifte van Na^+ ionen weer praktisch tot het normale peil teruggebracht worden. Met de methode van de reversibele haemolyse was het mogelijk deze relatie tussen ATP en het actief kationen-transport te bevestigen (Whittam, 1962).

Deze energie in de vorm van ATP kan afkomstig zijn van de glycolyse, zoals bij erythrocyten (Glynn, 1957), van de ademhaling, zoals bij volwassen nier (Whittam en Davies, 1953) of bij volwassen lever (van Rossum, 1964) of van beide processen, waarbij leucocyten (Elsbach en Schwartz, 1959) of kikkerskeletspier (Dydyńska en Harris, 1966) als voorbeeld genoemd kunnen worden.

I.4.1 Voorkomen van (Na^+-K^+) -ATPase

Nadat Skou in 1957 voor het eerst het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in krabbezenew aangetoond had, is er een grote reeks publicaties verschenen over het voorkomen van deze enzymatische activiteit in de natuur. Een belangrijk vergelijkend onderzoek werd uitgevoerd door Bonting en medewerkers (1961), die in 29 van 36 onderzochte weefsels van de kat (Na^+-K^+) -ATPase activiteit kon-

den aantonen, waarbij naar voren kwam, dat vooral zenuwweefsels en weefsels met een secretorische functie een hoge activiteit hadden, terwijl een lage activiteit gevonden werd in weefsels met een lage cellulaire dichtheid. Bij zoogdieren werd in zeer veel organen ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase activiteit gevonden. Wij noemen hier slechts maag (Bonting c.s., 1961), nier (Whittam en Wheeler, 1961; Bonting c.s., 1961), bijnier (Bonting c.s., 1961), lever (Bonting c.s., 1961) en pancreas (Järnefelt, 1962; Ridderstap en Bonting, 1968). Ook in erythrocyten (Post, 1959; Bonting c.s., 1961) en leucocyten (Block en Bonting, 1964) werd het enzymstelsel aangetoond. Naast spierweefsels, waaronder hart (Bonting c.s., 1961) werd ook in zintuigorganen ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase activiteit gevonden, waarbij genoemd mogen worden lensepitheel (Bonting c.s., 1963), retinale staafjes-cellen (Bonting c.s., 1964a) en het slakkenhuis van het oor (Kuypers c.s., 1967). Ook bij lagere diersoorten werd het enzymstelsel aangetoond, zoals in de zoutklier van de zilvermeeuw *Larus argentatus* (Hokin, 1963; Bonting c.s., 1964b) en het elektrisch orgaan van de *Electrophorus electricus* (Albers en Koval, 1962; Glynn, 1962a; Bonting en Caravaggio, 1963). Tot slot kan nog vermeld worden dat ook in elasmobranchi (Bonting, 1966), in cephalopoden (Bonting en Caravaggio, 1962) en in arthropoden (Lieberman, 1967) dit ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase systeem aangetoond is.

I.4.2 Eigenschappen van het ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase systeem

De ATPase activiteit, welke Skou in 1957 in krabbezenuw aantoonde, kon door Na^+ en K^+ ionen tezamen gestimuleerd worden. Door vele onderzoekers zijn op grond van de verkregen resultaten een aantal eigenschappen van dit enzymstelsel bepaald.

Bij erythrocyten is ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase activiteit in de membranen en bij geïsoleerde erythrocyten in de membraanfragmenten aangetoond (Hoffman, 1960; Glynn, 1962b), zodat hieruit geconcludeerd kan worden, dat het enzymstelsel in de celmembranen gelocaliseerd is. Dit wordt o.a. nog ondersteund door het feit, dat in de schede van de reuze-axon van de pijl-inktvis ($\text{Na}^+\text{-K}^+$)-ATPase activiteit gevonden werd (Bonting en Caravaggio, 1962) evenals in membranen van levercellen (Emmelot en Bos, 1966).

Het enzymstelsel hydrolyseert ATP tot ADP en P_i en het verschilt daarin van andere ATPase activiteiten, dat naast Mg^{2+} ionen ook Na^+ en K^+ ionen essentieel zijn voor maximale activiteit. Deze ionen hebben afzonderlijk praktisch geen invloed op de Mg^{2+} -geactiveerde ATPase. K^+ ionen kunnen vervangen worden door Rb^+ of NH_4^+ ionen, maar Na^+ ionen zijn essentieel voor dit enzym. Er zijn twee plaatsen met affiniteit voor kationen; een plaats aan de binnenkant van de membraan, waar de affiniteit voor Na^+ ionen hoger is dan

voor K^+ ionen en een plaats aan de buitenkant van de membraan met een grotere affiniteit voor K^+ ionen dan voor Na^+ ionen (Skou, 1960). Whittam (1962) heeft laten zien, dat in intacte cellen voor maximale ATPase activiteit Na^+ ionen aan de binnenzijde en K^+ ionen aan de buitenzijde van de membraan essentieel zijn. De conclusie is dus gewettigd, dat het enzymstelsel ATP hydrolyseert met een snelheid, die afhankelijk is van de concentratie van Na^+ ionen aan de binnenkant en van K^+ ionen aan de buitenkant van de celmembraan (Baker, 1963; Glynn, 1962b).

Het enzymstelsel, dat ATP hydrolyseert, is in staat de hierbij vrijkomende energie om te zetten in een beweging van de kationen. Het substraat voor het (Na^+-K^+) -geactiveerd enzymstelsel is ATP. Met andere nucleosidetriphosphaten, zoals ITP, GTP of UTP werd praktisch geen stimulering van de Mg^{2+} -geactiveerde phosphatase activiteit door Na^+ en K^+ ionen gevonden (Post c.s., 1960; Skou, 1960). Op het mechanisme van de (Na^+-K^+) -ATPase zal nog nader ingegaan worden (zie I.4.3).

In alle cellen, waarin een actief transport van Na^+ en K^+ ionen plaats vindt, is (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanwezig. Bonting en medewerkers (1962) hebben in 21 weefsels van 10 species, waarvan toentertijd bekend was dat daarin een actief transport van Na^+ en K^+ ionen voorkwam, nagegaan of het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in die cellen inderdaad aanwezig zou zijn. In alle gevallen werd een significante hoeveelheid van dit enzym aangetoond, waarbij de activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg nat gewicht . uur bij $37^\circ C$ varieerde van 1,24 in menselijke erythrocyten tot 1825 in hersenen van cavia's. In alle weefsels had het enzymstelsel een aantal overeenkomende karakteristieken.

Er blijkt een nauwe relatie te bestaan tussen de invloed van hartglycosiden op het kationentransport in de intacte cel en op het enzymstelsel. Hartglycosiden, zoals ouabaine, zijn specifieke remmers zowel van het ionentransport als van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. De gevoeligheid van de hartglycosiden kan verschillen voor enzymsystemen van verschillende weefsels van hetzelfde dier en voor hetzelfde weefsel van verschillende dieren. De concentratie ouabaine, waarmee half-maximale remming van het enzymstelsel en van het kationentransport gevonden werd, was dezelfde, zoals o.a. Bonting en medewerkers (1963) voor kalbslensepitheel aangetoond hebben.

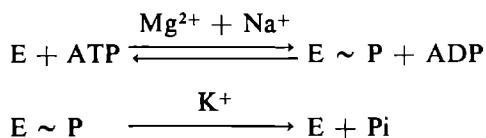
Post en medewerkers (1960) hebben laten zien, dat in erythrocyten de concentraties van Na^+ en K^+ ionen nodig voor half-maximale activering van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het kationentransport dezelfde zijn. Er is eveneens een duidelijk verband gevonden tussen de activiteit van het enzymstelsel en de intracellulaire concentraties van Na^+ en K^+ ionen. In erythrocyten met een laag natrium- en een hoog kaliumgehalte is een (Na^+-K^+) -ATPase acti-

teit aangetoond, die viermaal zo hoog is als in erythrocyten, die een hoog natrium- en een laag kaliumgehalte bezitten (Tosteson c.s., 1960; Tosteson, 1963). Hieruit kan geconcludeerd worden, dat het enzymesysteem dezelfde kwalitatieve verhouding heeft tot de concentraties van Na^+ en K^+ ionen als het transportsysteem in de intacte cel.

I.4.3 Mechanisme van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem

Het is begrijpelijk, dat vele pogingen in het werk gesteld zijn het mechanisme van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem op te helderen, nadat dit in vele weefsels aangetoond was. De membraanfragmenten, waarin de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit gelocaliseerd is, bevatten ook een enzym, dat een ATP-ADP uitwisselingsreactie katalyseert, waarvoor Mg^{2+} ionen noodzakelijk zijn (Skou, 1960). Met ATP^{32} , dat op de γ -plaats met ^{32}Pi gemerkt was, werd een Na^+ -afhankelijke overdracht van ^{32}Pi aan het enzym gevonden. Na toevoegen van K^+ ionen volgde een hydrolyse, waarbij Pi vrijkwam. Resultaten van deze uitwisselingsreactie en experimenten met ATP^{32} hebben duidelijk gemaakt, dat de hydrolyse van ATP tot ADP en Pi in twee stappen verloopt, waarbij de eerste stap een Mg^{2+} - en Na^+ -afhankelijke overdracht van Pi is op het enzym, waarna een dephosphorylering van het gefosphoryleerde enzym volgt door K^+ ionen. Deze phosphatase reactie kan door ouabaine geremd worden (Skou, 1960; Albers c.s., 1963; Post c.s., 1965; Gibbs c.s., 1965; Nagano c.s., 1965; Hokin c.s., 1965).

Het reactiemechanisme wordt dan:



waarin E het enzymcomplex en $\text{E} \sim \text{P}$ het energierijke gefosphoryleerde intermediair voorstelt.

Als mogelijke structuur voor dit intermediair heeft men aanvankelijk gedacht aan phosphatidinezuur gekoppeld aan het enzym, maar deze gedachtegang is inmiddels weer verlaten (Hokin en Hokin, 1964; Glynn c.s. 1965).

De aanwezigheid van een esterbinding, waarbij phosphorylserine beschouwd wordt als deel van het intermediair bij het transport van de kationen werd als tweede mogelijkheid naar voren gebracht (Ahmed en Judah, 1965). Ook Hokin en Yoda (1964) komen op grond van experimenten met Di-isopropylfluorophosfaat tot de conclusie, dat serine betrokken is bij het actief centrum van het enzymesysteem, maar niet zelf gefosphoryleerd of gedeposphoryleerd wordt.

Als derde mogelijkheid is voorgesteld, dat een acylphosphaat het intermediair in het (Na^+-K^+) -ATPase systeem zou zijn. De argumenten voor deze opvatting zijn de stabiliteit in zuur milieu, de reactiviteit bij hoge pH en het feit dat hydroxylamine Pi vrijmaakt (Nagano c.s., 1965; Hokin c.s., 1965). Tot deze conclusie komen ook Bader en medewerkers (1966). Door splitsing met pepsine en kolomchromatographie hebben Kahlenberg en medewerkers (1967) aangetoond, dat het intermediair een L-glutamyl- γ -phosphaat zou zijn. Schoner en medewerkers (1966) evenals Chignell en Titus (1966) hebben in microsomen van runderhersen aangetoond, dat een enzym-gebonden acylphosphaat geen intermediair kan zijn in het (Na^+-K^+) -ATPase systeem op grond van experimenten met NH_2OH . Fahn en medewerkers (1968) hebben echter in microsomen van het electrisch orgaan van *Electrophorus electricus* gevonden, dat NH_2OH in eenzelfde percentage de dephosphorylering van het gefosphoryleerde enzym beïnvloedt als de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit, waaruit zij concluderen, dat een gefosphoryleerd intermediair een rol speelt in het (Na^+-K^+) -ATPase systeem.

Wanneer wij aannemen, dat een gefosphoryleerd intermediair een rol speelt, blijft uiteraard de vraag nog open, op welke manier deze chemisch gebonden energie omgezet kan worden in „osmotische” energie, waardoor Na^+ en K^+ ionen de celmembraan passeren kunnen. Alle modellen voor het pompmechanisme zijn gebaseerd op een carrier, die ionen door het membraan kan vervoeren, waarbij er enerzijds van uitgegaan wordt, dat de ionen een complex vormen met een relatief klein molecuul, anderzijds, dat een groot molecuul zijn vorm zodanig kan veranderen, dat wat eerst naar het cytoplasma toegekeerd is, daarna in contact gebracht kan worden met de extracellulaire vloeistof. In het model van Shaw (1954), aangegeven door Glynn (1956), Post en medewerkers (1965) en Baker (1966), verplaatst zich van binnen naar buiten een complex, dat gefosphoryleerd is en drie atomen natrium draagt: $\text{Na}_3\text{-E-P}$. Dit complex zal aan de buitenzijde van de membraan natrium afstaan, waarvoor twee K^+ ionen in de plaats komen. Het zo gevormde $\text{K}_2\text{-E-P}$ complex kan zich dan van buiten naar binnen verplaatsen, waar het niet alleen gedeposphoryleerd wordt, maar ook kalium afstaat. De vrije carrier kan dan opnieuw drie Na^+ ionen opnemen en gefosphoryleerd worden door een kinase met behulp van ATP en onder invloed van Mg^{2+} ionen, waarbij weer $\text{Na}_3\text{-E-P}$ ontstaat.

Opit en Charnock (1965) nemen als uitgangspunt voor het model, dat zij opstellen, de configuratie van de z.g. eenheidsmembraan van Davson en Danielli (1943). Deze bestaat uit een dubbellaag fosfolipiden met aan weerszijden een laag eiwit. Aan de binnenkant van de membraan is de ATPase activiteit gelocaliseerd op het eiwit, dat uit een zeer geordende polariseerbare

keten bestaat met vele positieve en negatieve ionogene groepen. Doordat de Na^+ ionen zich vasthechten aan de negatieve ionogene groepen van de keten, zullen er vele ionenparen ontstaan, waarbij een herverdeling van de electronendichtheid plaats vindt. Het gevolg hiervan is, dat op de plaats van het actief centrum met behulp van ATP een gefosphoryleerd intermediair gevormd wordt. Hierdoor zal er een verder inductief effect ontstaan en een herverdeling van de electronendichtheid langs de polariseerbare keten van het eiwit, hetgeen resulteert in een deformatie hiervan. Door deze verandering van vorm en van de adsorptie-energie wordt natrium uitgewisseld tegen kalium aan de buitenkant van de membraan. Op de plaats van het actief centrum kan door verschuiving in de electronendichtheid gemakkelijk anorganisch fosfaat afgesplitst worden. Het eiwit zal dan weer zijn oorspronkelijke vorm innemen, waardoor K^+ ionen a.h.w. de cel indraaien. In de cel kunnen deze weer uitgewisseld worden tegen Na^+ ionen, waarna de cyclus opnieuw kan beginnen. Dit model verschilt niet wezenlijk van dat van Albers en medewerkers (1968).

Lowe (1968) suggereert een ander model, waarbij het ATPase molecuul naar de binnen- of buitenzijde van de cel kan open- of dichtklappen. Het substraat hierbij is een complex tussen ATP, Mg^{2+} en Na^+ . Als gevolg van de binding van dit complex verandert het enzymmolecuul van structuur, waarbij de binnenzijde van de cel afgesloten en de buitenzijde geopend wordt. Na^+ ionen kunnen dan uitgewisseld worden tegen K^+ ionen in het extracellulaire medium. De hydrolyse van ATP vindt alleen plaats, als alle Na^+ ionen uitgewisseld zijn tegen K^+ ionen, waarbij tegelijk met de hydrolyse het enzymmolecuul van vorm verandert, zodat K^+ ionen in het intracellulaire medium terecht kunnen komen. Stone (1968) heeft onlangs een kinetisch model voor het pompmechanisme beschreven door gebruik te maken van een computer. Het model komt goed overeen met de eigenschappen van het enzymstelsel, die experimenteel onderzocht zijn.

I.4.4 (Na^+ - K^+)-ATPase en K^+ -afhankelijke fosfatase

Uit het bovenstaande is naar voren gekomen, dat bij het (Na^+ - K^+)-ATPase systeem eerst een phosphorylering van het enzym optreedt, waarna het enzym-fosfaat-complex weer gedefosphoryleerd wordt. Deze laatste reactie wordt gestimuleerd door K^+ ionen en geremd door ouabaine. Het is dan ook begrijpelijk, dat men nagegaan heeft of in die weefsels, waarin (Na^+ - K^+)-ATPase activiteit aangetoond is, ook een fosfatase voorkomt, die door K^+ ionen gestimuleerd en door ouabaine geremd kan worden.

Bij een onderzoek naar het phosphoproteïne metabolisme hebben Judah en medewerkers (1962) aangetoond, dat een phosphokinase en een K^+ -gestimu-

leerde phosphatase activiteit in gezuiverde celmembranen van erythrocyten aanwezig zijn. Deze laatste enzymatische activiteit werd bepaald met p-nitrophenylphosphaat als substraat. De stimulering door K^+ ionen kon door ouabaine teniet gedaan worden. De verdeling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit en van de K^+ -afhankelijke phosphatase activiteit over verschillende celfracties van hersenen, nier en lever van cavia's was volledig dezelfde (Nagai c.s., 1966). Door zuivering van de (Na^+-K^+) -ATPase volgens de NaI methode werd een identieke toename van de specifieke activiteit van beide enzymen waargenomen, waaruit geconcludeerd kan worden, dat beide enzymen nauw verwant zijn (Nagai c.s., 1966). Daarentegen constateerden Albers en medewerkers (1965) een verschillende verdeling van beide enzymatische activiteiten over de diverse mitochondriale subfracties van rattehersenen. Naast p-nitrophenylphosphaat zijn vooral carbamylphosphaat en acetylphosphaat goede substraten voor de K^+ -afhankelijke phosphatase (Izumi c.s., 1966). Tot dezelfde conclusie zijn Bader en Sen (1966) gekomen, die een groot aantal fosphaatcomponenten getest hebben en constateerden, dat alleen met carbamylphosphaat en acetylphosphaat als substraat een K^+ -afhankelijke enzymatische activiteit verkregen werd, welke vergelijkbaar is met de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit.

Deze phosphatase activiteit kon niet alleen door K^+ ionen, maar ook door Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ en Li^+ ionen in verschillende mate gestimuleerd worden (Bader en Sen, 1966; Izumi c.s., 1966). Toevoegen van Na^+ ionen veroorzaakte een duidelijke remming van de K^+ -afhankelijke phosphatase activiteit (Fujita c.s., 1966; Israel en Titus, 1967). Ook door ouabaine werd deze stimulering van de phosphatase activiteit door K^+ ionen geheel geremd (Bader en Sen, 1966; Yoshida c.s., 1966; Israel en Titus, 1967). Hoewel Bader en Sen (1966) en Israel en Titus (1967) waarnamen, dat ATP de K^+ -afhankelijke acetylphosphatase activiteit competitief remde en acetylphosphaat de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit op dezelfde manier remde, komen Fujita en medewerkers (1966) tot de bevinding, dat in beide gevallen deze remming non-competitief was. Sachs en medewerkers (1967) en Formby en Clausen (1968) daarentegen vonden een competitieve remming van de K^+ -gestimuleerde acetylphosphatase door ATP.

Hoewel een groot aantal overeenkomsten gevonden is tussen de K^+ -afhankelijke phosphatase en het (Na^+-K^+) -ATPase systeem, zijn verschillende onderzoekers niet overtuigd, dat beide enzymatische activiteiten identiek zijn. Albers en Koval (1966) menen, dat beide enzymatische activiteiten „manifestations of distinct entities” zijn, waarnaast Fujita en medewerkers (1966) stellen, dat er twee verschillende actieve centra zijn, die al of niet op één enkel enzymmolecuul gelocaliseerd zijn. Ook Israel en Titus (1967) zijn van mening dat de K^+ -gestimuleerde phosphatase een ander enzymstelsel is dan de K^+ -afhankelijke activiteit, die het gefosphoryleerd intermediair van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem

hydrolyseert. Op grond van incorporatieproeven met gemerkt acetylphosfaat nemen Sachs en medewerkers (1967) aan, dat twee gefosforyleerde intermediären een rol spelen in het (Na^+-K^+) -ATPase systeem.

I.5 Relatie van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem tot het actief transport van Na^+ en K^+ ionen

Skou, die in 1957 het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in krabbezenuw ontdekt had, suggereerde toen reeds, dat er een verband zou bestaan tussen deze ATPase activiteit en het transport van Na^+ en K^+ ionen via de celmembraan. Een zorgvuldige vergelijking van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van „ghosts” van erythrocyten met het actief transport van Na^+ en K^+ ionen in intacte erythrocyten maakt duidelijk, dat het transportsysteem en de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit vele overeenkomsten bezitten, en dat er weinig twijfel is, dat beide processen nauw met elkaar verbonden zijn (Post c.s., 1960; Dunham en Glynn, 1961). Als punten van overeenkomst kunnen genoemd worden, dat beide processen zich in de celmembraan afspelen en energie in de vorm van ATP vereist is. Na^+ ionen kunnen alleen uit de cel gepompt worden, wanneer K^+ ionen in de extracellulaire vloeistof aanwezig zijn; voor de ATPase activiteit zijn beide monovalente kationen noodzakelijk. Ouabaine remt zowel het transport van de kationen als de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit; de remming is volledig bij dezelfde concentratie. Een bepaalde moleculaire configuratie van ouabaine is noodzakelijk om zowel het (Na^+-K^+) -ATPase systeem als het transport van de kationen volledig te remmen. De concentratie, waarin Na^+ en K^+ ionen half-maximale activering en ouabaine half-maximale remming geven, is voor beide processen dezelfde.

Bonting en medewerkers (1962) hebben voor alle weefsels, waarin destijds een ouabaine-gevoelig kationentransport aangetoond was, nagegaan of daarin ook dit (Na^+-K^+) -ATPase systeem aanwezig zou zijn. Dit kon voor alle onderzochte weefsels bevestigd worden. Ook voor lensepitheel bleek de correlatie tussen het (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het kationentransport volledig op te gaan, waarbij tien verschillende karakteristieken volledig overeenkwamen (Bonting, 1964).

In *Ulva lactuca* konden Bonting en Caravaggio (1966) geen invloed van ouabaine op het kationentransport en geen (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aantonen. In planten is het (Na^+-K^+) -ATPase systeem slechts éénmaal gevonden (Brown en Altschul, 1964). Zij verkregen in zaden van *Arachis hypogaea* wel een ATPase activiteit, die dezelfde eigenschappen had als het door Skou (1957) beschreven ATPase, maar een relatie met het kationentransport konden zij echter niet vinden.

I.6.1 Natrium- en kaliumtransport in *Escherichia coli*

K^+ ionen zijn nodig voor bacteriegroei (Lester, 1958). De absorptie van deze ionen vindt alleen plaats na toevoegen van een substraat, terwijl een stikstofbron hiervoor niet noodzakelijk is. In *Escherichia coli* is de opname van kalium afhankelijk van verschillende factoren, zoals de concentratie van glucose en K^+ ionen, de temperatuur, de pH en het buffersysteem. Vele van deze factoren beïnvloeden ook de beweging van K^+ ionen naar buiten (Roberts c.s., 1949).

Een uitgebreid onderzoek naar het kationentransport in *Escherichia coli* is in de jaren 1960–1965 uitgevoerd door Solomon en medewerkers. Evenals vele dierlijke weefsels is ook *Escherichia coli* in staat ten opzichte van de omringende vloeistof een hoog intracellulair kaliumgehalte en een laag intracellulair natriumgehalte te handhaven. In het eerste deel van de logaritmische groeifase bevatten de bacteriën 211 mmol kalium en 55 mmol natrium per l celwater, terwijl extracellulair 5 mmol kalium en 117 mmol natrium per l aanwezig zijn. In het verdere verloop van de groeicurve veranderen zowel het intracellulaire kaliumgehalte als het natriumgehalte. Dit laatste neemt toe tot 110 mmol per l celwater, terwijl het kaliumgehalte daalt tot 40 mmol per l celwater. Deze afname in het intracellulaire kaliumgehalte gaat vergezeld van een afname in de pH van het groeimedium, omdat het aantal cellen toeneemt, de cellen ouder worden en producten van het bacteriële metabolisme in het groeimedium terecht komen (Schultz en Solomon, 1961). Twee argumenten zijn aan te voeren, dat in *Escherichia coli* een K^+-H^+ uitwisseling optreedt. Niet alleen gaat kaliumopname gedurende de groei en vermenigvuldiging van de cellen vergezeld van een daling in de pH van het groeimedium, maar ook wordt de kaliumopname geremd door een lage extracellulaire pH. Gedurende de „steady-state” is de snelheid van H^+ efflux zestien maal groter dan de snelheid van de K^+ influx. De H^+ efflux kan dus niet in 1:1 verhouding staan tot de K^+ influx, maar kan gepaard gaan met een aanzienlijke secretie van anionen (Schultz c.s., 1962).

Wanneer nu bacteriecellen in de stationaire fase, die een laag intracellulair kaliumgehalte en een relatief hoog intracellulair natriumgehalte hebben, in een vers groeimedium gesuspenderd worden, vindt een kaliumopname plaats. Dit is een proces, waarvoor energie vereist is. Hierbij moet onderscheid gemaakt worden tussen twee influxprocessen:

1. Een snelle opname van korte duur, die voor ongeveer 60% van de totale kaliumopname zorgt. Deze opname kan beschreven worden als een 1:1 uitwisseling van extracellulaire K^+ ionen tegen intracellulaire H^+ ionen.
2. Dit proces verloopt langzamer en kan beschreven worden als een 1:1 uitwisseling van extracellulaire K^+ ionen tegen intracellulaire Na^+ ionen (Schultz c.s., 1963).

Deze wederzijdse relatie tussen de kalium- en natriumbewegingen voert uiteraard tot de vraag of deze beide fluxen ook gekoppeld zijn, zoals voor erythrocyten boven reeds beschreven is. Schultz en Solomon (1961) voeren twee argumenten aan, dat dit voor *Escherichia coli* niet het geval is. Wanneer de bacteriën gesuspenderd worden in een vers groeimedium van pH 4,2, wordt de kaliumopname geremd, terwijl de natriumafgifte niet verandert. Door NaF (30 mM) wordt de natriumafgifte volledig geremd, waarbij de kaliumopname 90% van de controlewaarde blijft. Het mechanisme voor natrium- en kaliumtransport in *Escherichia coli* verloopt dan ook onafhankelijk van elkaar. Günther en Dorn (1966b) komen op grond van experimenten met *Escherichia coli* en met een K-deficiënte mutant van *Escherichia coli* tot de conclusie, dat er een nettotransport van kalium is tegen de concentratiegradiënt in, welke afhankelijk is van het metabolisme. Zij menen, dat er in *Escherichia coli* een carrier-afhankelijke diffusie is van kalium uit de cel. Bij deze conclusie sluiten Epstein en Schultz (1966) zich aan door te stellen, dat er een carrier-afhankelijke efflux is van kalium, die nauw verbonden is met de influx. Als verklaring geven zij aan, dat er sprake is van een uitwisselingsdiffusie, waarbij een kalium-carrier-complex zich in beide richtingen in de celmembraan kan bewegen.

1.6.2 (Na⁺-K⁺)-ATPase in bacteriën

Solomon (1962) heeft in een overzichtsartikel over het ionentransport in *Escherichia coli* vermeld, dat een ATPase activiteit aanwezig is. Deze kan door K⁺ ionen gestimuleerd en door ouabaine geremd worden. Hij stelt dan, dat het kaliumtransport in dit micro-organisme afhankelijk is van een ATPase activiteit. Uit een persoonlijke mededeling van Epstein en Solomon (1966) werd ons echter duidelijk, dat zij slechts een lage ATPase activiteit en geen stimulering door Na⁺ of K⁺ ionen konden aantonen in *Escherichia coli*. Kleber en Aurich (1967) hebben in *Pseudomonas aeruginosa* de opname van carnitine bestudeerd. Dit transport bleek afhankelijk te zijn van de aanwezigheid van Na⁺ en K⁺ ionen en kon geremd worden door hoge concentraties ouabaine (2×10^{-2} M). Zij postuleren op deze indirecte grond, dat een (Na⁺-K⁺)-gestimuleerde, ouabaine-afhankelijke ATPase betrokken is bij het transport van carnitine. Er kon geen (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit aangetoond worden in *Escherichia coli* (Günther en Dorn, 1966a), *Vibrio parahaemolyticus* (Hayashi en Uchida, 1965), *Staphylococcus aureus* (Gross en Coles, 1968), *Pseudomonas* en *Cytophaga* (Drapeau en MacLeod, 1963) en mycoplasmamembranen (Rottem en Razin, 1966).

I.7 Doelstelling van dit onderzoek

Nadat het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem en het daarmee verbonden actief transport in vele dierlijke weefsels was aangetoond, was het interessant na te gaan in hoeverre dit transportsysteem verder in de natuur verspreid is. Omdat over het voorkomen hiervan in micro-organismen weinig bekend was, hebben wij voor een onderzoek naar de aanwezigheid van dit systeem en de mogelijke relatie met het kationentransport de bacterie *Escherichia coli* gekozen. Solomon en medewerkers hadden reeds een uitvoerig onderzoek naar het kationentransport in *Escherichia coli* uitgevoerd. Weliswaar had Solomon (1962) destijds reeds vermeld, dat een ouabaine-gevoelige ATPase activiteit aanwezig was, maar de verschillende eigenschappen van het enzymesysteem waren niet bepaald evenmin als een relatie met het kationentransport gelegd was, zodat niet duidelijk werd of werkelijk (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit aanwezig was.

Wij hebben dit probleem benaderd door een onderzoek in te stellen naar:

1. Voorkomen en eigenschappen van het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem.
2. Invloed van ouabaine op het intracellulair natrium- en kaliumgehalte.
3. Opname van ⁸⁶Rb⁺ en een mogelijke remming hiervan door ouabaine.

Een deel van de resultaten beschreven in de hoofdstukken III, IV, V en VIII zijn reeds gepubliceerd (Hafkenschied en Bonting, 1968a; Hafkenschied, 1968; Hafkenschied en Bonting, 1969).

METHODEN EN MATERIALEN

II 1 Kweken en oogsten van de micro-organismen

Escherichia coli, stam K-12, werd verkregen van Prof. T. O. Wikén, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool, Delft*. Latarjet en Caldas (1952) hebben deze gram-negatieve, niet-lysogene stam voor het eerst beschreven. De stam werd bij 4° C op een vaste voedingsbodem (trypton soya agar) in leven gehouden, waarbij iedere maand op een nieuwe voedingsbuis overgeënt werd, die na 24 uur incubatie bij kamertemperatuur opnieuw in de ijskast bewaard werd.

Als groeimedium voor de bacteriën werd het door Schultz en Solomon (1961) beschreven, synthetisch medium gebruikt met een kleine modificatie. Dit medium bevatte: (mmol/l) NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; KCl 5; glucose 60; pH 7,0. De zouten werden opgelost in 800 ml en de glucose in 200 ml gedestilleerd water. Nadat beide oplossingen bij 120° C gedurende 15 minuten bij 1 atm gesteriliseerd waren, werden ze na afkoelen steriel gemengd. Een volume van 500 ml van dit medium werd geïnoculeerd met 15 ml van een cultuur, die zich in de logaritmische groeifase bevond, en geïncubeerd bij 37° C gedurende 24 uur zonder aëren. De dichtheid van de celcultuur tijdens de groei werd gemeten bij 400 m μ met behulp van een Coleman-spectrofotometer. De cellen in de laat-stationaire fase werden geoogst door 15 minuten te centrifugeren bij 4° C en 8.000 x g. Na tweemaal uitwassen met dubbel-gedestilleerd water werd de celsuspensie gelyophiliseerd bij -20° C. De droge cellen werden bewaard bij -25° C.

Voor de enzymatische bepaling werd een bepaalde hoeveelheid van de droge cellen gehomogeniseerd in dubbel-gedestilleerd water in een glazen Potter-Elvehjem buis en dit homogenaat werd als enzymbron gebruikt.

* De bemiddeling hierbij van Dr. Ir. G. D. Vogels en zijn hulp bij de microbiologische problemen heb ik zeer gewaardeerd.

II.2 Enzymatische bepalingen

II.2.1 Bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit

Bij het begin van ons onderzoek hebben wij voor de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit gebruik gemaakt van de methode van Bonting en medewerkers (1961), die voor dierlijke weefsels ontworpen werd. De modificaties door Bonting en Caravaggio (1966) aangebracht hebben wij overgenomen en tevens alle volumina met een factor 50 vermenigvuldigd.

Voor bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit moet gebruik gemaakt worden van de z.g. differentiële bepalingsmethode. In een compleet medium (medium A) wordt de totale ATPase activiteit bepaald d.w.z. de som van de (Na^+-K^+) -geactiveerde, ouabaine-gevoelige en van de niet- (Na^+-K^+) -geactiveerde, ouabaine-ongevoelige ATPase activiteit. Door weglaten van K^+ (medium B), van Na^+ (medium C), toevoegen van ouabaine (medium D) of weglaten van K^+ en toevoegen van ouabaine (medium E) is het mogelijk de ouabaine-ongevoelige ATPase activiteit te bepalen. Uit het verschil van medium A en het gemiddelde van de media B, C, D en E is de (Na^+-K^+) -geactiveerde, ouabaine-gevoelige ATPase activiteit te berekenen.

De samenstelling van de incubatiemedia was als volgt: (mmol/l) medium A: Tris-HCl (pH 7,5) 94; Na^+ 60; K^+ 5; Mg^{2+} 1; CN^- 10; EDTA 0,1; ATP dinatriumzout 2. Medium B: hetzelfde als A maar K^+ vervangen door Na^+ . Medium C: Tris-HCl (pH 7,5) 100; K^+ 5; Mg^{2+} 1; CN^- 5; EDTA 0,1; ATP ditriszout 2. Medium D: hetzelfde als A *plus* 10^{-4} M ouabaine. Medium E: hetzelfde als B *plus* 10^{-4} M ouabaine.

Aan 3,75 ml van de verschillende incubatiemedia werd 0,25 ml van het homogenaat toegevoegd, waarna 0,5 ml hiervan gedurende 1 uur bij 37°C geïncubeerd werd. Eveneens werd aan 0,5 ml direct 2,25 ml 10% TCA toegevoegd; dit diende als enzymblanco. Na de incubatie werd 2,25 ml 10% TCA toegevoegd om de enzymatische reactie te remmen en het eiwit te precipiteren, waarna gecentrifugeerd werd. Aan 1,5 ml van de supernatant werd eenzelfde volume kleurreagens toegevoegd. Hiervoor werd 8 g FeSO_4 opgelost in een 1% oplossing van ammoniumheptamolybdaat in 1,15 N H_2SO_4 . De extinctie werd gemeten bij 700 m μ in een Zeiss-spectrofotometer PMQ II met dubbel-gedestilleerd water als blanco. Alle bepalingen werden in triplo uitgevoerd.

Als standaard voor de bepaling van Pi werd een oplossing van KH_2PO_4 (50 mM) gebruikt. Aan 10 of 5 ml van het medium A (zonder homogenaat) werd 0,1 ml van deze oplossing toegevoegd, waarna aan 0,5 ml van beide aldus verkregen oplossingen 2,25 ml 10% TCA toegevoegd werd. Aan 1,5 ml van deze oplossing werd eenzelfde volume kleurreagens toegevoegd. De extincties bij 700 m μ correleerden met 0,25 respectievelijk 0,50 μmol Pi. Met behulp

hiervan was het mogelijk de totale ATPase activiteit, de ouabaine-ongevoelige ATPase activiteit en de ouabaine-gevoelige ATPase activiteit uit te drukken in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur. Analooq aan voorbeelden in de literatuur hebben wij de totale ATPase activiteit (medium A) op 100% gesteld, waarna zowel de ouabaine-ongevoelige als de ouabaine-gevoelige ATPase activiteit berekend konden worden als percentages van de totale ATPase. Om verwarring met de hierna te beschrijven methode te voorkomen zullen wij deze bepalingmethode voor de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit methode I noemen.

In de loop van ons onderzoek werd echter duidelijk, dat deze methode voor de bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit in *Escherichia coli* niet geheel voldeed. Daarom werden de bovengenoemde media A t/m E met drie nieuwe incubatiemedia uitgebreid. De concentratie van Mg²⁺ werd van 1 tot 2 mM verhoogd. Het CN⁻ werd weggelaten, nadat gebleken was, dat dit geen invloed op de gemeten activiteit had. Voor de samenstelling van de incubatiemedia kan verwezen worden naar tabel I. Incubatie en analyse werden onveranderd uitgevoerd zoals eerder in deze paragraaf beschreven is. Deze methode zal methode II genoemd worden.

TABEL I Samenstelling (in mmol/l) van de incubatiemedia voor bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit (methode II)

	Incubatiemedium							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Tris-HCl (pH 7,5)	94	94	98	94	94	98	100	100
Na ⁺	60	60	—	60	60	—	—	—
K ⁺	5	—	5	5	—	5	—	—
Mg ²⁺	2	2	2	2	2	2	2	2
EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ATP *	2	2	2	2	2	2	2	2
ouabaine	—	—	—	0,1	0,1	0,1	—	0,1

* Voor de incubatiemedia C en F werd ATP ditriszout gebruikt, voor de overige media ATP dinatriumzout. Na⁺, K⁺ en Mg²⁺ ionen werden toegevoegd als chloriden.

II.2.2 Bepaling van de Mg²⁺-ATPase activiteit

Voor de bepaling van de Mg²⁺-ATPase activiteit bij pH 8,7 was het incubatiemedium als volgt samengesteld: (mmol/l) Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg²⁺ 2; EDTA 0,1; ATP dinatriumzout 2. De methode van incuberen en de bepaling van Pi zijn reeds in II.2.1 beschreven. De activiteit werd uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

II.2.3 Bepaling van de zure phosphatase activiteit

Het incubatiemedium voor de bepaling van de zure phosphatase activiteit was als volgt samengesteld: (mmol/l) glycine-HCl (pH 2,5) 85; p-nitrophenylphosfaat dinatriumzout 7,5. Aan 7,5 ml van dit medium werd 0,5 ml homogenaat toegevoegd, waarna 1 ml afgenomen werd voor incubatie bij 37° C gedurende 1 uur. Eveneens werd aan 7,5 ml van het medium 0,5 ml water toegevoegd en hiervan 1 ml op dezelfde manier geïncubeerd; dit diende als substraat-blanco. Na de incubatie werd 2 ml 0,1 N NaOH toegevoegd om de reactie te remmen, het eiwit te precipiteren en het gevormde p-nitrophenol te kleuren. Na centrifugeren werd de extinctie van de supernatant gemeten bij 410 mμ, waarbij dubbel-gedestilleerd water als blanco gebruikt werd. Alle bepalingen werden in triplo uitgevoerd.

Met behulp van een ijklijn gemaakt met p-nitrophenol was het mogelijk deze enzymatische activiteit uit te drukken in molen p-nitrophenylphosfaat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

II.3 Bereiden van een cel-vrij extract voor de zure phosphatase

Voor het isoleren van de zure phosphatase activiteit uit *Escherichia coli* werd gebruik gemaakt van de methode van de „osmotische shock” (Dvorak c.s., 1967). Daartoe werden bacteriën geoogst in de laat-stationaire fase en drie-maal uitgewassen met een oplossing van 0,01 M Tris-HCl (pH 7,3), die 0,03 M NaCl bevatte. Door roeren gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur werden de bacteriën gesuspenderd in 0,033 M Tris-HCl (pH 7,3) + 20% sucrose en 2×10^{-3} M EDTA. Per gram nat gewicht werd hiervoor 40 ml van deze oplossing gebruikt. Door centrifugeren werd de bovenstaande vloeistof verwijderd, waarna de bacteriën onderworpen werden aan een plotselinge osmotische verandering door suspenderen in koud water (40 ml per gram nat gewicht). De suspensie werd 10 minuten in de koude geroerd, waarna door centrifugeren de z.g. „shock fluid” verkregen kon worden. Door lyophiliseren werd deze oplossing geconcentreerd. Het residu verkregen na de eerste maal centrifugeren werd nog tweemaal met water gewassen en eveneens gelyophiliseerd.

II.4 Bepaling van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname*

De bepaling van de opname van $^{86}\text{Rb}^+$ werd uitgevoerd in een incubatie-

* Deze metingen werden verricht op de isotopenafdeling van het laboratorium voor Biochemie. Ik ben Dr. J. H. Veerkamp hiervoor dankbaar.

medium, dat gelijk was aan het groeimedium van de bacteriën, waarbij echter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en KCl weggelaten werden. Het medium bevatte 0,5 mC $^{86}\text{Rb}^+$ per liter. Aan 200 μl van dit medium werd 50 μl homogenaat toegevoegd, waarna 5 minuten bij 37° C geïncubeerd werd. Direct hierna werd 200 μl van de suspensie op een millipore filter (gemiddelde poriënwijde: 0,45 μ) afgezogen en uitgewassen met 5 druppels van het $^{86}\text{Rb}^+$ vrije incubatiemedium. Voor een correctie van het aspecifiek-geabsorbeerde $^{86}\text{Rb}^+$ werd 200 μl van het incubatiemedium plus homogenaat zonder incubatie direct afgezogen en uitgewassen. De $^{86}\text{Rb}^+$ opname werd geteld gedurende 400 sec in een Philips PW 4119 scintillatietelbuis, aangesloten op een PW 4251 teller. De waarde verkregen zonder incubatie werd afgetrokken van de waarde verkregen na incubatie, waarna het aantal desintegraties per minuut (dpm) berekend kon worden. De $^{86}\text{Rb}^+$ opnamesnelheid werd uitgedrukt in het aantal dpm/mg eiwit. De meeste bepalingen werden in triplo uitgevoerd, enkele echter in zesvoud.

De bacteriën voor deze experimenten werden geoogst in de laat-stationaire fase, tweemaal uitgewassen met dubbel-gedestilleerd water en gesuspenseerd in 15 ml water.

II.5 Bepaling van het natrium- en kaliumgehalte

Voor de bepaling van het natrium- en kaliumgehalte werden de bacteriën na oogsten tweemaal met dubbel-gedestilleerd water gewassen en gelyophiliseerd. Een afgewogen hoeveelheid (ca 20 mg) van het droge materiaal werd opgenomen in 0,1 ml 70% HNO_3 , waarna 10 minuten in een waterbad bij 65°–70° C gedestruëerd werd. Na een nacht overstaan werd 4 ml dubbel-gedestilleerd water toegevoegd, waardoor een neerslag ontstond, dat door centrifugeren verwijderd werd. In de supernatant werd na een aangepaste verdunning met behulp van een Eppendorf-vlamfotometer het natrium- en kaliumgehalte bepaald. Ook deze bepalingen werden in triplo uitgevoerd.

Als standaard voor deze bepalingen werden 4 oplossingen gebruikt, die respectievelijk 0,10, 0,20, 0,40 en 0,80 meq Na^+ per liter en 0,010, 0,020, 0,040 en 0,080 meq K^+ per liter bevatten. Door interpolatie kon uit deze gegevens het natrium- en kaliumgehalte van de bacteriën, uitgedrukt in eq/kg droog gewicht berekend worden.

II.6 Eiwitbepaling

De eiwitbepaling werd uitgevoerd volgens de methode van Lowry en medewerkers (1951) met runderserumalbumine als standaard. Berekend op basis van het droog gewicht was 75–80% van het materiaal eiwit. Een micro-Kjeldahl

bepaling waarbij serumalbumine eveneens als standaard gebruikt werd, leverde eenzelfde percentage eiwit t.o.v. het droog gewicht.

II.7 Bereiding van het Triszout van ATP

Op een Amberlite IR-120 (Tris-vorm) kolom (25 x 1,7 cm) werd 500 mg ATP dinatriumzout in 1,5 ml water gebracht. Door elutie met water kon met behulp van een bij 254 m μ registrerende Uvicord (LKB, Stockholm) het uv-positieve materiaal verzameld en door lyophiliseren geconcentreerd worden. De bepaling van de concentratie van ATP werd uitgevoerd volgens Estabrook en Maitra (1962)*.

II.8 Statistische analyse

Voor statistische bewerking van de verkregen resultaten werd gebruik gemaakt van de Student t-toets. Voor een nadere beschouwing hiervan kan verwezen worden naar Lacey (1957). In zoverre bij de statistische berekeningen tabellen noodzakelijk waren hebben wij gebruik gemaakt van het tabellenboek van Fischer en Yates (1963), waarbij tweezijdig getoetst werd. Als toetsresultaat is de overschrijdingskans P opgegeven, waarbij de significantiegrens gelegd werd bij $P \leq 0,05$.

II.9 Materialen

De volgende chemicaliën werden van onderstaande leveranciers betrokken. Adenosinetriphosfaat dinatriumzout (1); adenosinedifosfaat trinatriumzout (1); adenosinemonofosfaat dinatriumzout (1); guanosinetriphosfaat dinatriumzout (2); uridinetriphosfaat diammoniumzout (2); cytosinetriphosfaat dinatriumzout (2); thymidinetriphosfaat trinatriumzout (2); inosinetriphosfaat trinatriumzout (2); erythrophleïnesulfaat (3); p-nitrophenylphosfaat dinatriumzout (3); glucose 1-phosfaat dinatriumzout (1); glucose 6-phosfaat dinatriumzout (1); fructose 1-phosfaat dicyclohexylammoniumzout (1); fructose 1,6-difosfaat trinatriumzout (1); 3-phosphoglycerinezuur trinatriumzout (1); 2,3-difosphoglycerinezuur pentacyclohexylammoniumzout (1); phosphoenolpyruvaat tricyclohexylammoniumzout (1); acetylphosfaat dilithiumzout (2); runderserumalbumine (4); ouabaine (3) en (5); p-nitrophenol (6); 2,4-dinitrophenol (6); penicilline (7); lysozyme (5); $^{86}\text{Rb}^+$ (8); Amberlite IR-120 (H^+ -vorm) (6).

* Mej. E. D. Kuhlmann was zo vriendelijk deze bepalingen voor mij uit te voeren.

Andere chemicaliën waren alle p.a.

- (1) C. F. Boehringer und Soehne GmbH., Mannheim, Duitsland.
- (2) Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, V.S.
- (3) E. Merck AG, Darmstadt, Duitsland.
- (4) Behringwerke AG, Marburg-Lahn, Duitsland.
- (5) Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, V.S.
- (6) The British Drug Houses Ltd., Poole, Engeland.
- (7) Kon. Ned. Gist- en Spiritusfabriek N.V., Delft, Nederland.
- (8) Philips Duphar, Amsterdam, Nederland.

(Na⁺-K⁺)-ATPASE: AANWEZIGHEID EN ENIGE
EIGENSCHAPPEN VAN HET ENZYMSYSTEEM

III.1 Inleiding

Het uitgangspunt van ons onderzoek vormde het aantonen van het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem in *Escherichia coli* om zodoende een bijdrage te leveren tot het beter begrijpen van het transport van Na⁺ en K⁺ ionen in dit micro-organisme. Omdat het voorkomen van dit enzymesysteem in bacteriën nog nooit beschreven was, hebben wij in eerste instantie voor de enzymatische bepaling dezelfde methoden gebruikt, waarmee (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit in zoogdierweefsels aangetoond kan worden. In een incubatiemedium, dat naast Mg²⁺ en ATP ook Na⁺ en K⁺ ionen bevat, kan de z.g. totale ATPase activiteit bepaald worden. Door weglaten van Na⁺ en/of K⁺ ionen uit dit medium of door toevoegen van de specifieke remmer ouabaine is het mogelijk de z.g. Mg²⁺-geactiveerde ATPase activiteit te bepalen. Het verschil tussen de totale ATPase en de Mg²⁺-ATPase geeft dan de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit weer. Het bepalen van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit op deze manier impliceert, dat Na⁺ of K⁺ ionen en ouabaine geen invloed mogen uitoefenen op de Mg²⁺-ATPase activiteit. Is dit wel het geval, dan moet een correctie worden aangebracht.

In de loop van ons onderzoek (hoofdstuk IV) werd echter duidelijk, dat Na⁺ en K⁺ ionen afzonderlijk een sterk stimulerende invloed hebben op de Mg²⁺-ATPase activiteit van *Escherichia coli*, waarbij de Mg²⁺-ATPase activiteit gedefinieerd wordt als de mate van hydrolyse van ATP, wanneer alleen Mg²⁺-ionen als cofactor in het incubatiemedium aanwezig zijn. Dit is dus in tegenstelling met de omschrijving, die vaak in de literatuur gegeven is (Bonting, 1964), waarbij de Mg²⁺-ATPase activiteit gedefinieerd wordt als de activiteit, die verkregen wordt, wanneer K⁺ of Na⁺ ionen uit het incubatiemedium voor de bepaling van de totale ATPase activiteit weggelaten worden. Dit betekent dus, dat naast ATP en Mg²⁺ altijd nog respectievelijk Na⁺ of K⁺ ionen aanwezig zijn. Om verwarring te voorkomen zullen wij deze activiteit rest ATPase noemen.

Omdat in hoofdstuk IV de eigenschappen van de Mg²⁺-ATPase activiteit, die door een enkel monovalent kation gestimuleerd wordt, uitvoerig beschreven worden, zullen wij hier de rest ATPase slechts noemen, voorzover dit noodzakelijk is.

III.2 Voorbehandeling van bacteriën met ureum

Aanvankelijk werd gepoogd de $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ activiteit aan te tonen door gebruik te maken van de methode van Bonting en medewerkers (1961). Deze methode werd toegepast voor de $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ bepaling in dierlijke weefsels. Bij deze werkwijze wordt van de weefsels een 10% homogenaat gemaakt, dat gelyophiliseerd wordt. Dit aldus verkregen droge materiaal wordt opgenomen in een bepaalde hoeveelheid water en gehomogeniseerd, waarna de enzymatische bepaling uitgevoerd kan worden. Bij ons onderzoek werden de bacteriën na oogsten tweemaal gewassen met dubbel-gedestilleerd water om zoveel mogelijk het groeimedium te verwijderen, waarna gelyophiliseerd werd. De enzymatische bepaling werd uitgevoerd met een homogenaat van deze gelyophiliseerde bacteriën. De op deze manier verkregen waarde voor de $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ activiteit in *Escherichia coli* vormde slechts een zeer gering percentage van de totale ATPase activiteit. Wanneer wij deze methodiek verder toegepast hadden, zou een bestudering van de diverse enzymatische eigenschappen van het $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ systeem in dit micro-organisme vrijwel onmogelijk geweest zijn wegens de lage relatieve activiteit.

Het belangrijkste verschil met de dierlijke weefsels, waarin $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ activiteit is aangetoond, is gelegen in het feit, dat bacteriën een celwand bezitten. Daarom hebben wij geprobeerd op verschillende manieren de celwand te verwijderen en daardoor een hogere relatieve activiteit van het enzym te verkrijgen. Hiertoe werden 4 methoden gevolgd:

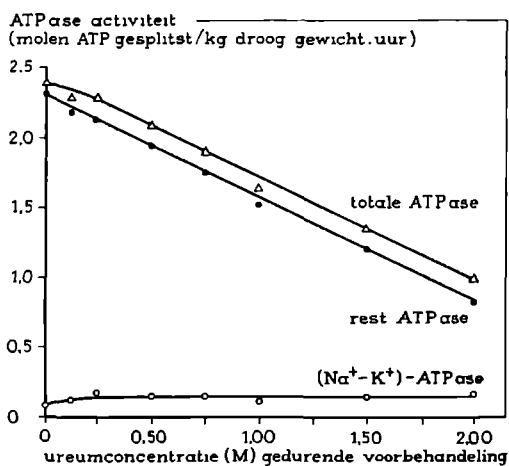
1. Bereiden van een cel-vrij extract. De bacteriën werden na suspenderen in water verschillende tijden in een MSE 500-W ultrasone desintegrator getrild, waarna de enzymatische activiteit bepaald werd in deze kapot-getrilde bacteriecellen of in supernatant en precipitaat verkregen na centrifugeren bij $100.000 \times g$ gedurende 1 uur bij 4°C .
2. Spheroplastenvorming in groeiende cellen met behulp van penicilline. De spheroplasten werden in water tot lyse gebracht, waarna de enzymatische bepaling uitgevoerd werd met het precipitaat verkregen na centrifugeren bij $100.000 \times g$. Ook intacte spheroplasten werden aan een enzymp bepaling onderworpen.
3. Bereiden van protoplasten met de lysozyme-EDTA methode van Repaske (1956). De protoplasten werden gecentrifugeerd en direct voor de enzymatische bepaling gebruikt.
4. Schudden van een bacteriesuspensie met glasparsels gedurende 2 minuten. Na centrifugeren werd zowel in supernatant als in precipitaat de enzymatische activiteit bepaald.

Deze methoden leverden niet het gewenste resultaat, omdat wel de rest

ATPase, maar niet de (Na^+-K^+) -ATPase aantoonbaar was in meer dan minimale hoeveelheden. Langham en Kostelnik (1965) hadden reeds aangetoond, dat de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanzienlijk verlaagd wordt, nadat cornea's van konijnen ultrasonisch getrild waren.

Uit het werk van Glynn en medewerkers (1965) en van Skou en Hilberg (1965) is bekend, dat na voorbehandelen van weefsels met een geconcentreerde ureumoplossing de rest ATPase activiteit vermindert, maar de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit niet significant verandert. Bakkeren en Bonting (1968a) hebben geconstateerd, dat de enzymatische eigenschappen van de (Na^+-K^+) -ATPase van rattelever na voorbehandelen met 1,5 M ureum niet veranderen. Als deze methode, waarbij het weefsel gehomogeniseerd wordt in een ureumoplossing ook toepasbaar zou zijn op bacteriën, zou de rest ATPase activiteit verlaagd kunnen worden, waardoor het mogelijk zou zijn de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit nauwkeurig te bepalen.

Wij hebben dan ook de gelyophiliseerde bacteriën gehomogeniseerd in ureumoplossingen van verschillende molariteit en na 1 uur bewaren bij 0°C de enzymatische activiteit bepaald. Figuur 1 geeft het resultaat van deze voorbehandeling met ureum weer. De afname van zowel de totale ATPase activiteit als



FIGUUR 1 Invloed van voorbehandeling met ureum op de totale ATPase, de rest ATPase en de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+) -ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Bacteriën: 0,4 mg.

van de rest ATPase activiteit was praktisch lineair met toenemende concentratie van ureum, terwijl de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit constant bleef. Dit betekent, dat door deze voorbehandeling met ureum de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit beter meetbaar werd, omdat deze enzymatische activiteit procentueel aanmerkelijk toenam. Wanneer ureum direct toegevoegd werd aan het incubatiemedium in concentraties van 0,008 M tot 0,125 M d.w.z. in concentraties verkregen, nadat de met ureum voorbehandelde bacteriën verdund waren met incubatiemedium, werd geen verandering van de enzymatische activiteit waargenomen evenmin als een effect op de fosphaatbepaling. Inderdaad blijkt deze methode dus geschikt te zijn om de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit van *Escherichia coli* te bepalen en voor bestudering van de enzymatische eigenschappen werd er dan ook gebruik van gemaakt.

III.3 Relatieve ATPase activiteiten in verschillende substraatmedia met of zonder voorbehandeling met ureum

Tabel II geeft de relatieve ATPase activiteiten van *Escherichia coli* in de verschillende substraatmedia weer. De activiteit gemeten in medium A (totale

TABEL II Relatieve ATPase activiteiten van *Escherichia coli* in verschillende substraatmedia zonder en met voorbehandeling met 1,5 M ureum.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I.

Zonder voorbehandeling met ureum bacteriën: 0,125 mg.

Met voorbehandeling met ureum bacteriën: 0,4 mg.

Activiteit uitgedrukt als percentage van de totale ATPase activiteit.

Medium	ATPase activiteit (%)			
	— ureum		+ ureum	
A (totaal)	100	(12)	100	(11)
B (geen K ⁺)	95,2 ± 1,3	(10)	88,8 ± 1,0	(8)
C (geen Na ⁺)	92,0 ± 3,2	(12)	88,1 ± 3,2	(9)
D (10 ⁻⁴ M ouabaine)	96,8 ± 1,0	(10)		
D (10 ⁻² M ouabaine)			96,0 ± 0,7	(9)
E (geen K ⁺ ; 10 ⁻⁴ M ouabaine)	95,6 ± 1,9	(9)	87,6 ± 1,0	(8)
Gemiddelde in media B, C, D en E	95,2 ± 0,6		90,1 ± 2,0	

Activiteiten aangegeven als gemiddelde met standaardfout en tussen haakjes het aantal bepalingen.

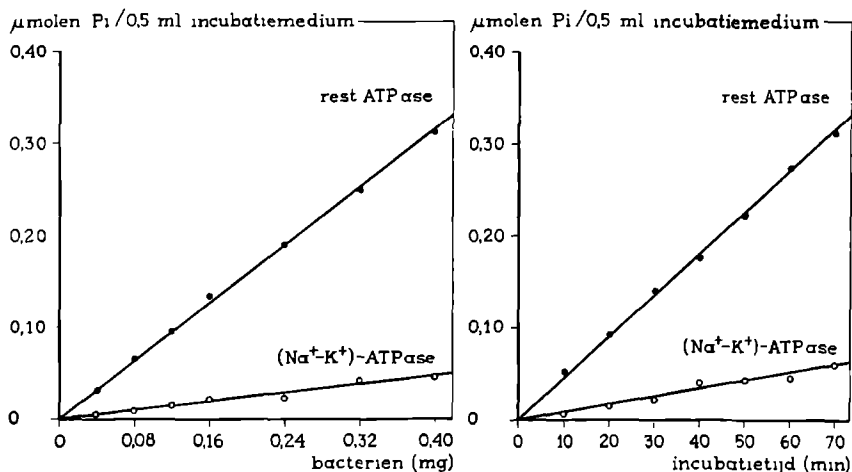
Gem. absolute activiteit in medium A zonder voorbehandeling:

2,19 ± 0,21 molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Gem. absolute activiteit in medium A met voorbehandeling met ureum:

0,84 ± 0,05 molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

ATPase) werd zowel zonder als met voorbehandeling met 1,5 M ureum op 100% gesteld. De absolute activiteit was dan respectievelijk $2,19 \pm 0,21$ en $0,84 \pm 0,05$ molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur. Door weglaten van Na^+ of K^+ ionen uit het incubatiemedium werd na voorbehandeling met ureum een activiteit gevonden, die ongeveer 12% lager was dan die van de totale ATPase. De verlaging in activiteit in medium D (10^{-2} M of 10^{-4} M ouabaine) was minder dan in de andere media. In analogie aan dergelijke bepalingen voor zoogdierweefsels werd ook hier een gemiddeld percentage berekend voor de media B, C, D en E, dat na voorbehandelen met ureum 90,1% was. Dit betekent dus, dat volgens de normale gedachtengang 9,9% van de totale ATPase (Na^+-K^+)-ATPase was. Zonder voorbehandeling met ureum was dit slechts 4,8%.



FIGUUR 2 (links) Snelheid van de hydrolyse van ATP als functie van de hoeveelheid toegevoegde bacteriën.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+)-ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,04 tot 0,4 mg.

FIGUUR 3 (rechts) Snelheid van de hydrolyse van ATP als functie van de incubatietijd. De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+)-ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

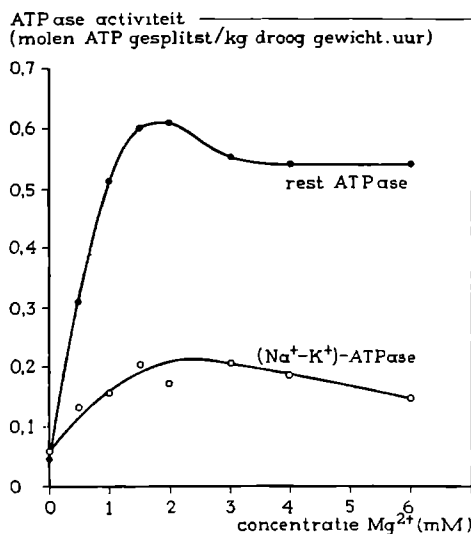
III.4 Reactiesnelheid als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd

In figuur 2 is de snelheid van de hydrolyse van ATP als functie van de hoeveelheid bacteriën weergegeven. Zowel voor de (Na^+-K^-) -ATPase als voor de rest ATPase werd in het geteste gebied van 0,04 tot 0,40 mg bacteriën een lineair verband gevonden.

In het gemeten tijdsinterval, tot 70 minuten, was de reactiesnelheid zowel van de (Na^+-K^+) -ATPase als van de rest ATPase rechtevenredig met de incubatietijd, zoals in figuur 3 weergegeven is. Onder de normale experimentele omstandigheden werd ongeveer 40% van het ATP gehydrolyseerd.

III.5 Mg^{2+} -activeringscurve

Omdat Mg^{2+} de normale cofactor is voor ATPase activiteit werd de invloed van een toenemende concentratie Mg^{2+} op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit en de rest ATPase activiteit nagegaan (figuur 4). Bij een constante concentratie ATP (2 mM) werd zowel voor de (Na^+-K^+) -ATPase als voor de rest ATPase een maximale activiteit gevonden bij 2 mM Mg^{2+} , hetgeen betekent, dat de



FIGUUR 4 Invloed van Mg^{2+} ionen op de rest ATPase en de (Na^+-K^+) -ATPase activiteiten van *Escherichia coli*.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I zonder Mg^{2+} met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+) -ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Eindconcentratie Mg^{2+} : 0,5 tot 6,0 mM. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

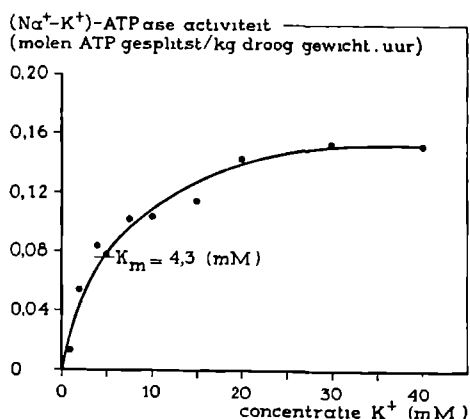
optimale Mg^{2+} : ATP verhouding 1:1 is. Ook in afwezigheid van Mg^{2+} ionen was er een geringe ATPase activiteit; waarschijnlijk werd deze veroorzaakt door de aanwezigheid van endogeen Mg^{2+} in de bacteriecellen.

Deze optimale Mg^{2+} : ATP verhouding komt overeen met de verhouding gevonden voor de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in rattelever (Bakkeren en Bonting, 1968a), krabbezenuw (Skou, 1957), spierweefsels van cavia's (Portius en Repke, 1967) en celmembranen van Ehrlich-ascites tumorcellen van muizen (Schön en Menke, 1967). In tegenstelling hiermede vond Bonting (1966) een maximale (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in de rectale klier van de elasmobranchi bij 3-4 mM Mg^{2+} en 2 mM ATP.

III.6 Invloed van K^+ ionen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit

Voor activering van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem is de aanwezigheid van zowel Na^+ als K^+ ionen vereist. Het is dan ook mogelijk in aanwezigheid van een constante hoeveelheid K^+ de Na^+ -afhankelijkheid en in aanwezigheid van een constante concentratie Na^+ de K^+ -afhankelijkheid na te gaan. Dit laatste is voor de (Na^+-K^+) -ATPase van *Escherichia coli* in figuur 5 weergegeven. Maximale activiteit werd verkregen bij 30-40 mM K^+ , terwijl de K_m waarde gelijk was aan 4,3 mM.

Deze curve voor *Escherichia coli* heeft een ander verloop dan voor de meeste dierlijke weefsels, waar in het algemeen reeds maximale activering bij 5 mM K^+



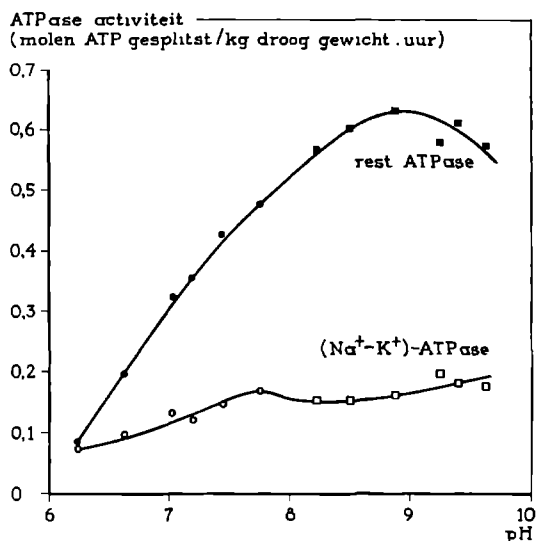
FIGUUR 5 Invloed van K^+ ionen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

Samenstelling van incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 7,5) 94; Na^+ 60; Mg^{2+} 1; CN^- 10; EDTA 0,1; ATP 2; K^+ 1 tot 40. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

bereikt wordt, terwijl de K_m waarde bij 0,6–1,0 mM ligt. Dit is het geval bij rattelever (Bakkeren en Bonting, 1968a), lensepitheel van kat, kalf of konijn (Bonting c.s., 1963), de zoutklier van de zilverbreeuw (Bonting c.s., 1964b) en de rectale klier van de elasmobranchi (Bonting, 1966). Voor hartspeer van cavia's hebben Portius en Repke (1967) in aanwezigheid van 135 mM Na^+ een maximale activering bij 20 mM K^+ en een K_m waarde van 2 mM gevonden. Bij een gedeeltelijk gezuiverd enzym uit rattehartspier was bij 140 mM Na^+ voor maximale activering 10 mM K^+ nodig, waarbij de K_m waarde 1,4 mM was (Tashima c.s., 1966). Het enzymesysteem in *Escherichia coli* heeft dus een geringere affiniteit voor K^+ ionen dan de meeste andere weefsels.

III.7 pH Optimum

De pH activiteitscurven voor de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit en de rest ATPase activiteit zijn in figuur 6 weergegeven. Voor de rest ATPase werd een



FIGUUR 6 Invloed van de pH op de rest ATPase activiteit en (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+) -ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten.

Samenstelling van de buffermengsels: pH 6,25–7,75 \circ — \circ en \bullet — \bullet
 Tris-histidine-HCl beide 50 mM, pH 8,20–9,65 \square — \square en \blacksquare — \blacksquare
 Tris-HCl 100 mM. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

optimum bij pH 8,9 gevonden. Deze waarde komt goed overeen met het pH optimum, dat in het algemeen voor de rest ATPase of Mg^{2+} -ATPase van dierlijke weefsels aangetoond is.

Voor de (Na^+-K^+) -ATPase van *Escherichia coli* werd een zeer flauw optimum bij pH 7,7 gevonden. Door de geringe absolute activiteit van de (Na^+-K^+) -ATPase en de relatief grote rest ATPase activiteit bij hogere pH's was het meten van de pH-afhankelijkheid zeer moeilijk. Niettemin komt deze waarde van 7,7 voor het optimum van de (Na^+-K^+) -ATPase redelijk overeen met waarden gevonden voor hetzelfde enzymesysteem uit diverse bronnen, b.v. pH 7,3 voor lensepitheel (Bonting c.s., 1963), pH 7,2 voor de zoutklier van de zilverbreeuw (Bonting c.s., 1964b), pH 6,3-7,0 voor de rectale klier van de elasmobranchi (Bonting, 1966) en pH 7,3 voor rattelever (Bakkeren en Bonting, 1968a), terwijl pH 7,4 optimaal is voor de (Na^+-K^+) -ATPase van celmembranen van Ehrlich-ascites tumorcellen (Schön en Menke, 1967).

III.8 Substraatspecificiteit

De activiteit van beide phosphatasen voor diverse substraten is in tabel III weergegeven. De (Na^+-K^+) -afhankelijke phosphatase activiteit was specifiek voor ATP en ADP; de rest phosphatase activiteit was echter weinig specifiek.

Deze eigenschappen voor *Escherichia coli* zijn niet geheel in overeenstemming

TABEL III Substraatspecificiteit van de nucleotide phosphatase activiteit van *Escherichia coli*.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+-K^+) -ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Eindconcentratie van de substraten: 2 mM. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

Activiteit uitgedrukt in molen substraat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Substraat	Totale phosphatase	Rest phosphatase	(Na^+-K^+) -geactiveerde phosphatase
ATP	0,94	0,76	0,18
ADP	0,56	0,44	0,12
AMP	0,10	0,08	0,02
GTP	0,47	0,51	0
CTP	0,30	0,28	0,02
UTP	0,30	0,27	0,03
ITP	0,48	0,43	0,05
TTP	0,21	0,20	0,01

met verschillende literatuurgegevens voor dierlijke weefsels. Zo vonden Tashima en medewerkers (1966), dat CTP en ADP ook gehydrolyseerd werden in aanwezigheid van Na^+ en K^+ ; wel was deze phosphatase activiteit veel geringer dan met ATP als substraat. Portius en Repke (1967) toonden aan dat ATP, CTP en ITP substraten waren voor de (Na^+-K^+) -afhankelijke, ouabaine-gevoelige phosphatase van de hartspeer van cavia's, maar CTP en ITP waren veel minder effectief dan ATP. Voor de (Na^+-K^+) -afhankelijke phosphatase activiteit van de celmembranen van Ehrlich-ascites tumorcellen gaf ADP 40 % van de activiteit van ATP (Schön en Menke, 1967), terwijl Rosenberg en Rosenberg (1968) voor het darmepitheel van cavia's slechts met ATP en niet met ADP of AMP een (Na^+-K^+) -afhankelijke phosphatase activiteit konden aantonen.

III.9 Invloed van monovalente kationen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit

Voor maximale activiteit van de (Na^+-K^+) -ATPase zijn zowel Na^+ als K^+ ionen noodzakelijk. De invloed van verschillende monovalente kationen op dit enzymstelsel werd nagegaan door hetzij Na^+ of K^+ te vervangen door één uit een reeks van verschillende monovalente kationen in aanwezigheid van een constante hoeveelheid K^+ respectievelijk Na^+ ionen. Op deze manier is het mogelijk de kationenspecificiteit van het enzymstelsel nader te bestuderen.

III.9.1 Vervanging van K^+ ionen door andere monovalente kationen

In tabel IV is de invloed van verschillende monovalente kationen op de

TABEL IV Invloed van verschillende monovalente kationen op de ATPase activiteit van *Escherichia coli* in aanwezigheid van 60 mM Na^+ .

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (zonder K^+) en medium E. De kation-geactiveerde ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase activiteit in medium A met het toegevoegde kation en de ATPase activiteit in het normale medium E.

Eindconcentratie van de monovalente kationen: 5 mM. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Kation	Totale ATPase	Rest ATPase	Kation-geactiveerde ATPase
Li^+	0,45	0,43	0,02
Na^+	0,44	0,43	0,01
K^+	0,57	0,42	0,15
Rb^+	0,54	0,42	0,12
Cs^+	0,45	0,42	0,03
NH_4^+	0,60	0,45	0,15

ATPase activiteit van *Escherichia coli* in aanwezigheid van een constante concentratie Na^+ (60 mM) weergegeven. Rb^+ en NH_4^+ ionen gaven eenzelfde activering van de ATPase activiteit als K^+ ionen, d.w.z. K^+ ionen konden door Rb^+ of NH_4^+ ionen vervangen worden in het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. De rest ATPase bleef in alle gevallen constant.

Voor de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van krabbezenuw is aangetoond, dat K^+ ionen de grootste affiniteit voor het enzymstelsel bezitten gevolgd door Rb^+ en NH_4^+ ionen (Skou, 1960). Voor rattelever (Bakkeren en Bonting, 1968a) en voor lensepitheel (Bonting c.s., 1963) werd gevonden, dat K^+ ionen geheel vervangen kunnen worden door Rb^+ ionen, waarbij de maximale activering en de K_m waarde voor beide ionen geheel overeenkomen. Ook Portius en Repke (1967) kwamen voor hartspeer van cavia's tot het resultaat, dat naast K^+ vooral Rb^+ en NH_4^+ ionen activerend kunnen werken op de ATPase activiteit in aanwezigheid van een constante hoeveelheid Na^+ . Voor de synaptosomale (Na^+-K^+) -ATPase van hersenen van cavia's werd aangetoond, dat niet alleen Rb^+ en NH_4^+ maar ook Li^+ ionen in staat waren K^+ ionen te vervangen (Kurokawa c.s., 1965). Uitgezonderd de activering door Li^+ ionen in het laatste geval zijn onze resultaten gelijk aan die verkregen voor het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in zoogdierweefsels.

III.9.2 Vervanging van Na^+ ionen door andere monovalente kationen

De invloed van verschillende monovalente kationen, toegevoegd in een eindconcentratie van 60 mM op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van *Escherichia coli* in aanwezigheid van 5 mM K^+ is in tabel V weergegeven. Ook nu werd gevonden, dat K^+ , Rb^+ en NH_4^+ ionen het grootste stimulerend vermogen hadden op de ATPase activiteit. Dit resultaat is niet in overeenstemming met hetgeen wij zouden verwachten. In aanwezigheid van K^+ ionen zou de grootste stimulering veroorzaakt moeten worden door Na^+ ionen. Weliswaar gaven ook Na^+ ionen een activering, maar deze was geringer dan die met K^+ of Rb^+ ionen.

Ook uit literatuurgegevens is bekend, dat Na^+ ionen activerend werken op de ATPase activiteit in aanwezigheid van K^+ ionen. In de synaptosomale (Na^+-K^+) -ATPase kon geen enkel monovalent kation Na^+ vervangen bij de activering (Kurokawa c.s., 1965). Ook in darmepitheel van cavia's waren naast K^+ ionen Na^+ ionen nodig voor maximale activiteit van de (Na^+-K^+) -ATPase; K^+ en Li^+ hadden geen effect en guanidine vertoonde een geringe remming (Rosenberg en Rosenberg, 1968). Dit resultaat voor *Escherichia coli* lag niet in de lijn der verwachting en de conclusie lag dus voor de hand, dat nog een ander effect van monovalente kationen op de ATPase activiteit een rol speelde.

TABEL V Invloed van verschillende monovalente kationen op de ATPase activiteit van *Escherichia coli* in aanwezigheid van 5 mM K⁺.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode I met medium A (zonder Na⁺) en medium E. De kation-geactiveerde ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase activiteit in medium A met het toegevoegde kation en de ATPase activiteit in het normale medium E.

Eindconcentratie van de monovalente kationen: 60 mM. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Kation	Totale ATPase	Rest ATPase	Kation-geactiveerde ATPase
Li ⁺	0,69	0,60	0,09
Na ⁺	0,73	0,56	0,17
K ⁺	0,80	0,53	0,27
Rb ⁺	0,77	0,51	0,26
Cs ⁺	0,63	0,51	0,12
NH ₄ ⁺	0,71	0,50	0,21

III.10 Discussie

Hoewel in dit hoofdstuk een aantal experimentele gegevens aangevoerd zijn om aan te tonen, dat het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem in *Escherichia coli* aanwezig is, komt er evenzeer een duidelijk argument naar voren, dat in tegengestelde richting wijst. Een aantal resultaten, zoals remming door ouabaine, ligging van het pH optimum, substraatspecificiteit en vervangbaarheid van K⁺ ionen door andere monovalente kationen behoren alle tot het normale patroon van een (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem, zoals dit voor zoogdierweefsels bekend is. De vervanging van Na⁺ ionen door andere monovalente kationen past echter niet in het totaal beeld.

Zoals reeds beschreven is, moeten voor een (Na⁺-K⁺)-ATPase bepaling naast Mg²⁺ en ATP Na⁺ en K⁺ ionen aanwezig zijn voor maximale activiteit en weglaten van één van beide ionen geeft dientengevolge een vermindering van de hydrolysesnelheid van ATP. Nu is bij de bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit in dierlijke weefsels altijd voorop gesteld, dat de enzymatische activiteit verkregen na weglaten van Na⁺ of K⁺ ionen uit het incubatiemedium voor de totale ATPase de Mg²⁺-ATPase activiteit representerde. Dit veronderstelt, dat één enkel kation, hetzij K⁺ hetzij Na⁺, geen activerend effect heeft op de ouabaine-ongevoelige Mg²⁺-ATPase activiteit.

De bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit van *Escherichia coli* was echter gecompliceerder. Voor de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit van dit micro-organisme konden Na⁺ ionen vervangen worden door K⁺, Rb⁺ en NH₄⁺ ionen,

(tabel V) m.a.w. deze Na^+ ionen waren onder de gebruikte experimentele omstandigheden voor activering niet essentieel, zoals dit wel het geval is voor de (Na^+-K^+) -ATPase van zoogdierweefsels. Het feit, dat zowel bij vervanging van K^+ ionen (tabel IV) als bij vervanging van Na^+ ionen (tabel V) door monovalente kationen eenzelfde reeks van maximale activering door deze ionen gevonden werd, nl. K^+ , Rb^+ en NH_4^+ , bracht ons er toe na te gaan in hoeverre de monovalente kationen ieder afzonderlijk een effect veroorzaakten op de Mg^{2+} -ATPase activiteit. Daarbij werd het duidelijk, dat al deze kationen, zij het in verschillende mate, een stimulerende invloed bij pH 7,5 op de Mg^{2+} -ATPase hadden. Dit betekent dus, dat door weglaten van Na^+ of K^+ ionen uit het incubatiemedium voor de bepaling van de totale ATPase activiteit in het geval van *Escherichia coli* een vermindering van de stimulerende invloed van monovalente kationen op de Mg^{2+} -ATPase gemeten kan worden. De rest ATPase activiteit moet dus in dit geval gedefinieerd worden als de som van de Mg^{2+} -ATPase activiteit in afwezigheid van kationen en van de Mg^{2+} -ATPase activiteit, die door monovalente kationen gestimuleerd kan worden. In een aantal micro-organismen is een dergelijke rest ATPase aangetoond.

Een betere maatstaf voor het aantonen en de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase in *Escherichia coli* zou kunnen zijn een vermindering in enzymatische activiteit van de totale ATPase door de specifieke remmer ouabaine, mits deze stof geen effect zou hebben op de Mg^{2+} -ATPase of op de stimulering van deze ATPase door monovalente kationen. In hoofdstuk V zal hierop uitvoerig ingegaan worden. Uit de gegevens van dit hoofdstuk blijkt in ieder geval, dat na toevoegen van ouabaine aan het incubatiemedium voor de totale ATPase een kleine, maar significante (3,2–4,0 %) remming van de totale ATPase optreedt, die aanduidt, dat er in *Escherichia coli* (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanwezig is. Voor een exacte bepaling van dit enzym moeten de eigenschappen van de rest ATPase volledig bekend zijn. Deze zullen in het volgende hoofdstuk besproken worden.

HOOFDSTUK IV

EIGENSCHAPPEN VAN EEN Mg^{2+} -ATPASE, GESTIMULEERD DOOR MONOVALENTE KATIONEN

IV.1 Inleiding

Uit het voorafgaande hoofdstuk is naar voren gekomen, dat de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in *Escherichia coli* niet op dezelfde manier uitgevoerd kan worden als voor zoogdierweefsels beschreven is door o.a. Bonting en medewerkers (1961), waarbij de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit berekend wordt uit het verschil van de totale ATPase en de Mg^{2+} -ATPase activiteit. Deze laatste kan bepaald worden door weglaten van Na^+ en/of K^+ ionen uit of door toevoegen van ouabaine aan het incubatiemedium voor de totale ATPase.

Voor de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in *Escherichia coli* was dit echter niet mogelijk, omdat de Mg^{2+} -ATPase activiteit d.w.z. de activiteit gemeten in aanwezigheid van alleen Mg^{2+} ionen door Na^+ of K^+ ionen gestimuleerd kon worden.

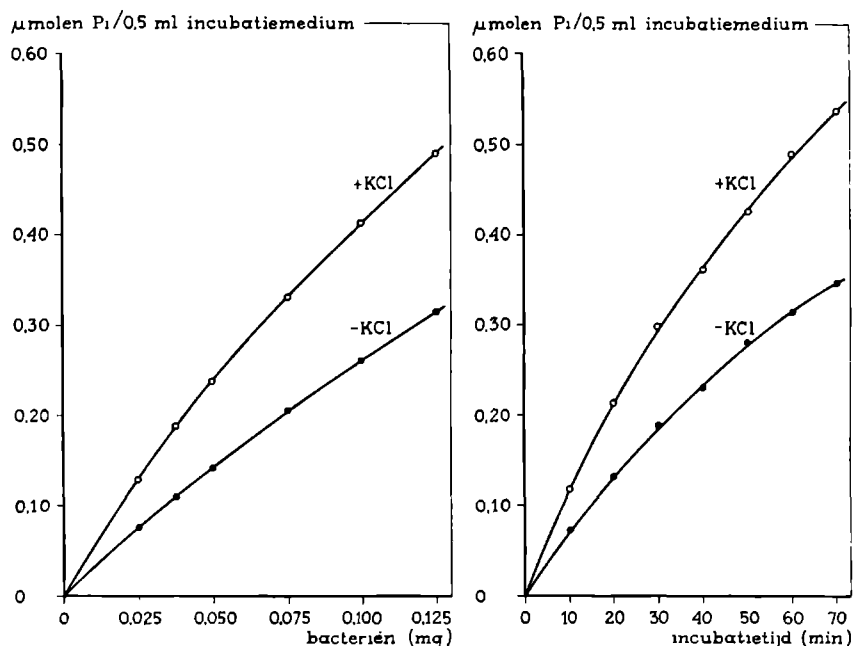
In dit hoofdstuk zullen een aantal eigenschappen van deze Mg^{2+} -ATPase beschreven worden.

IV.2 Reactiesnelheid van de Mg^{2+} -ATPase als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd

In figuur 7 is de Mg^{2+} -ATPase activiteit in afhankelijkheid van de toegevoegde hoeveelheid bacteriën weergegeven. Zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van toegevoegd KCl (eindconcentratie: 140 mM) was de reactiesnelheid in het gemeten gebied van 0,025 tot 0,125 mg praktisch rechtevenredig met de hoeveelheid bacteriën.

De reactiesnelheid van de Mg^{2+} -ATPase in afwezigheid en in aanwezigheid van KCl (eindconcentratie: 140 mM) als functie van de incubatietijd is in figuur 8 weergegeven. In het gemeten tijdsinterval tot 70 minuten was de reactiesnelheid ongeveer rechtevenredig met de incubatietijd. Onder de normale experimentele omstandigheden werd 40% van het ATP gehydrolyseerd.

Gruener en Neumann (1966) hebben voor een Mg^{2+} -ATPase uit bonenwortels, die door Na^+ ionen gestimuleerd kon worden, eenzelfde beeld verkregen voor de reactiesnelheid als functie van de incubatietijd. Zij concludeerden daar-



FIGUUR 7 (links) Snelheid van de hydrolyse van ATP als functie van de hoeveelheid toegevoegde bacteriën.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,025 tot 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

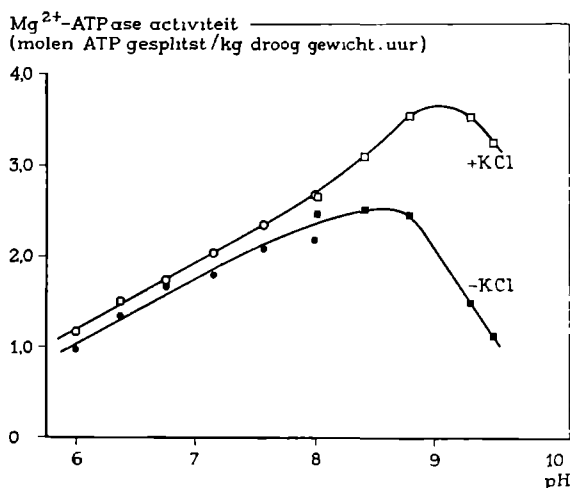
FIGUUR 8 (rechts) Snelheid van de hydrolyse van ATP als functie van de incubatietijd.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

uit, dat de invloed van NaCl berustte op een verhoging van de snelheid van de enzymatische reactie en niet toegeschreven kon worden aan een stabilisering van het enzym. Deze conclusie konden wij niet alleen met dit experiment, maar ook op een andere manier nog bevestigen (zie IV.5).

IV.3 pH Optimum

De invloed van de pH op de reactiesnelheid van de Mg^{2+} -ATPase is in figuur 9 weergegeven. In afwezigheid van KCl werd een optimum bij pH 8,7 gevonden. Deze pH waarde komt overeen met het pH optimum, dat voor de Mg^{2+} -ATPase activiteit in een aantal micro-organismen door verschillende onderzoekers verkregen is. Günther en Dorn (1966a) vonden voor de Mg^{2+} -ATPase van intacte cellen van *Escherichia coli* een pH optimum van 8,5, maar



FIGUUR 9 Invloed van de pH op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: pH 6,0–8,0 ● —● en ○ —○ Tris-histidine-HCl beide 100; pH 8,0–9,5 ■ —■ en □ —□ Tris-HCl 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

de activiteit van het enzym verkregen uit gelyseerde protoplasten was nog niet optimaal bij pH 9,2. Dit laatste werd ook waargenomen door Weibull en medewerkers (1962) voor „ghosts” van *Bacillus megaterium*. Daarentegen werd met Mg^{2+} als cofactor voor de ATPase activiteit van de oplosbare fractie van dit micro-organisme een pH optimum bij 7,5 verkregen. Voor een gesolubiliseerd ATPase uit membranen van *Streptococcus faecalis* werd een pH optimum van 8,0 gevonden (Abrams, 1965). Bragg en Hou (1967) hebben uit *Escherichia coli* door soniceren, fractioneren, solubiliseren en chromatographie over DEAE-cellulose vijf ATPase activiteiten verkregen, waarvan twee met een pH optimum bij 8,0–8,5.

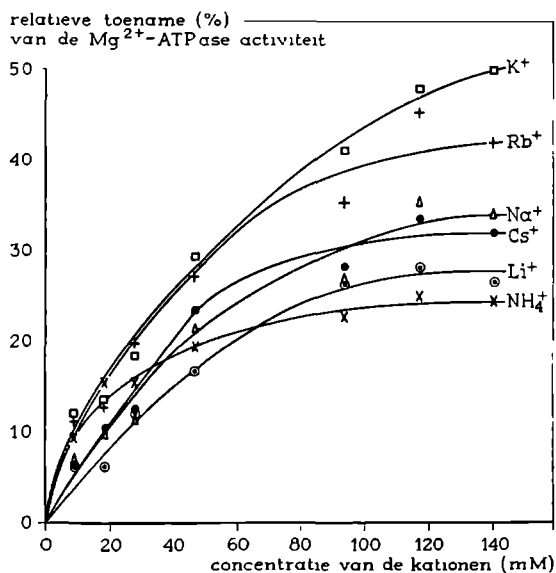
Toevoegen van KCl (eindconcentratie: 140 mM) verhoogde de specifieke activiteit van de Mg^{2+} -ATPase over het gehele gemeten pH traject. Hierbij trad een geringe verschuiving van het pH optimum naar hogere pH (9,1) op. Gruener en Neumann (1966) hebben in bonenwortels een Mg^{2+} -ATPase aangetoond, die door Na^+ of K^+ ionen gestimuleerd kon worden. In afwezigheid van deze ionen was de optimale pH 7,4. Na toevoegen van NaCl of KCl (200 mM) nam de specifieke activiteit toe, waarbij de grootste stimulering bij hoge pH (pH 8,0–9,5) plaats vond. In tegenstelling tot onze resultaten verkregen zij hierbij twee pH optima, te weten 7,0 en 9,1.

De activering van de Mg^{2+} -ATPase door KCl, zoals weergegeven in figuur 9 kan veroorzaakt worden door het kation of het anion. Wij hebben daarom de invloed van verschillende kationen en anionen op deze Mg^{2+} -ATPase nagegaan.

IV.4 Invloed van monovalente kationen op de Mg^{2+} -ATPase

In figuur 10 is de invloed van verschillende monovalente kationen, toegevoegd als chloriden, op de Mg^{2+} -ATPase activiteit weergegeven. Alle kationen hadden een stimulerende invloed. Bij lage concentraties (tot 20 mM) vertoonden K^+ , Rb^+ en NH_4^+ eenzelfde effect, maar bij hogere concentraties (120–140 mM) veroorzaakten K^+ en Rb^+ de grootste activiteitstoename. Wanneer cholinechloride in dezelfde concentratie aan het incubatiemedium toegevoegd werd, bleef de Mg^{2+} -ATPase activiteit constant. De toename van de Mg^{2+} -ATPase activiteit kon dus niet toegeschreven worden aan een verandering van de ionensterkte of de osmolariteit.

Deze resultaten zijn niet in overeenstemming met die van Günther en Dorn (1966a), die zowel voor intacte cellen als voor gelyseerde protoplasten van



FIGUUR 10 Invloed van monovalente kationen op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2; monovalente kationen 10–140. Bacteriën: 0,125 mg. De kationen werden toegevoegd als chloriden.

Escherichia coli een activering door Na^+ ionen waarnamen; K^+ ionen hadden geen effect. Bragg en Hou (1967) vonden geen invloed van Na^+ of K^+ ionen op de verschillende ATPase activiteiten, die zij door zuivering uit *Escherichia coli* verkregen. Eenzelfde resultaat werd voor de ATPase uit mycoplasma membranen gevonden (Rottem en Razin, 1966). De activering van de Mg^{2+} -ATPase van *Bacillus megaterium* door monovalente kationen geeft weer een ander beeld (Greenawalt c.s., 1962). Toevoeging van KCl en NaCl (50 mM) had geen invloed op de Mg^{2+} -ATPase van „ghosts”, wel echter op de oplosbare fractie van dit micro-organisme. Hierbij waren K^+ ionen 2 à 3 maal zo effectief als Na^+ ionen. Hogere concentraties (0,5–1,0 M) remden de Mg^{2+} -ATPase van de verschillende fracties. Voor het enzym uit *Streptococcus faecalis* werd alleen bij hogere concentraties van Na^+ of K^+ ionen (50 mM) een stimulering van de Mg^{2+} -ATPase geconstateerd, waarbij er geen quantitief verschil was tussen beide ionen (Abrams, 1965). Neujahr en medewerkers (1967) konden daarentegen geen stimulering van de Mg^{2+} -ATPase van *Streptococcus faecalis* door Na^+ ionen aantonen, terwijl in aanwezigheid van K^+ en Na^+ ionen tezamen in een verhouding 1:10 de grootste stimulering waargenomen werd. Wat de invloed van K^+ ionen alleen op deze Mg^{2+} -ATPase is hebben zij niet aangegeven. Ook bij de halophile bacterie *Vibrio parahaemolyticus* werd een stimulering van de Mg^{2+} -ATPase aangetoond (Hayashi en Uchida, 1965). Bij pH 8,5 en in aanwezigheid van 2 mM Mg^{2+} stimuleerden Na^+ ionen de Mg^{2+} -ATPase maximaal in een concentratie van 1,2–1,6 M, terwijl K^+ ionen in een concentratie van 3,0 M de grootste stimulering veroorzaakten. Ook in bonenwortels (Gruener en Neumann, 1966) en in wortels van penen en erwten (Dodds en Ellis, 1966) is een dergelijke stimulering van de Mg^{2+} -ATPase waargenomen. Uit dit overzicht blijkt, dat toevoeging van monovalente kationen een zeer verschillend effect heeft op de Mg^{2+} -ATPase van diverse micro-organismen en van enige planten.

IV.5 De invloed van KCl op de Mg^{2+} -ATPase: stimulering of stabilisering

De verhoging van de Mg^{2+} -ATPase activiteit door toevoeging van KCl aan het incubatiemedium zou het gevolg kunnen zijn van een stimulerende respectievelijk een stabiliserende werking op de enzymactiviteit. Om na te gaan welke van beide mogelijkheden juist is werden de bacteriën 10 minuten bij 37° C gepreïncubeerd in water of in een oplossing van KCl en de enzymatische activiteit vergeleken met een niet-gepreïncubeerd enzympreparaat. De resultaten zijn in tabel VI weergegeven. Zonder preïncubatie was de specifieke activiteit van de Mg^{2+} -ATPase 2,93; deze kon verhoogd worden tot 4,42 door incubatie in aanwezigheid van KCl. Werden de bacteriën gehomogeniseerd in een oplossing

TABEL VI Invloed van preïncubatie van de bacteriën in water of KCl oplossing op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2.

Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

De bacteriën werden gehomogeniseerd in water of in KCl oplossing (140 mM). De preïncubatie werd uitgevoerd bij 37° C gedurende 10 minuten in water of in KCl oplossing (140 mM).

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

		Bacteriën gehomogeniseerd in	Activiteit	
			— KCl	+ KCl
niet- gepreïncubeerd	{	H ₂ O	2,93	4,42
	{	KCl (140 mM)	3,29	4,43
10 min bij 37° C gepreïncubeerd	{	H ₂ O	2,32	3,44
	{	KCl (140 mM)	2,74	3,74

van KCl (eindconcentratie: 140 mM) dan was de specifieke activiteit 3,29. Deze verhoging van 2,93 tot 3,29 is begrijpelijk, omdat nu reeds in het incubatiemedium KCl (eindconcentratie: 8,75 mM) aanwezig is. Wanneer deze bacteriesuspensie geïncubeerd werd in aanwezigheid van KCl, nam de specifieke activiteit toe tot 4,43. Het maakte dus geen verschil of de bacteriën gehomogeniseerd werden in water of in een oplossing van KCl. Werd de bacteriesuspensie 10 minuten bij 37° C gepreïncubeerd, dan nam de enzymatische activiteit af, blijkbaar omdat het enzym enigszins gedenatureerd werd. Niettemin werd met dit gepreïncubeerde enzym praktisch eenzelfde patroon van enzymatische activiteiten gevonden. Bij incubatie in aanwezigheid van KCl werd nu met beide enzympreparaten niet volledig dezelfde activiteit verkregen, hetgeen er op wijst, dat er sprake is van enige stabiliserende werking van KCl op het enzym. Omdat echter bij deze incubatie een duidelijke verhoging van de enzymatische activiteit gevonden werd vergeleken bij de incubatie zonder KCl, mag hieruit geconcludeerd worden, dat KCl voornamelijk een stimulerende werking op het enzym uitoefent.

IV.6 Invloed van anionen op de Mg^{2+} -ATPase

Tabel VII toont de invloed van verschillende anionen, toegevoegd als kalium- of natriumzout, op de Mg^{2+} -ATPase activiteit. Alle kaliumzouten gaven een grotere verhoging van de Mg^{2+} -ATPase activiteit dan de respectievelijke natriumzouten in overeenstemming met het groter stimulerend vermogen van

TABEL VII Invloed van verschillende anionen op de Mg^{2+} -ATPase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 8,7.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l.

Tris-HCl (pH 8,7) 200; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg.

De anionen werden toegevoegd als natrium- of kaliumzouten. Eindconcentratie: 140 mM. Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Anion	Activiteit	
	natriumzout	kaliumzout
–	2,38	2,38
F ⁻	0,67	1,07
Cl ⁻	3,25	3,94
Br ⁻	3,27	3,98
I ⁻	2,75	3,28
NO ₃ ⁻	2,07	2,32
HCO ₃ ⁻	2,85	3,46
SO ₄ ²⁻	2,96	3,81
CH ₃ COO ⁻	5,62	6,15

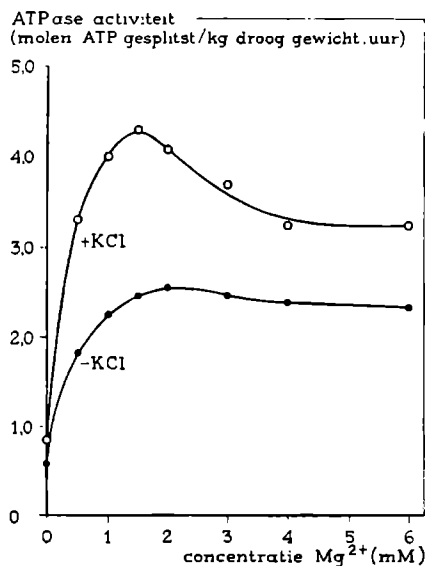
K⁺ ionen dan van Na⁺ ionen (figuur 10). In beide reeksen gaf acetaat de grootste stimulering, terwijl nitraat en vooral fluoride remmend werkten. Er is een grote overeenkomst tussen de twee reeksen wat de activering door de beide kationen betreft, maar naast de stimulerende werking van deze kationen hebben anionen ook een effect op de Mg^{2+} -ATPase.

Chung-mei Ling (1967) heeft de invloed van verschillende anionen op de Mg^{2+} -ATPase van een deeltjes-fractie van bakkersgist nagegaan en geconstateerd, dat na bicarbonaat, acetaat de grootste stimulering veroorzaakte; de mogelijkheid, dat kationen ook een invloed op de Mg^{2+} -ATPase zouden hebben werd echter niet uitgesloten.

IV.7 Mg^{2+} -activeringscurve

In figuur 11 is de invloed van Mg^{2+} ionen op de ATPase activiteit bij een constante concentratie ATP (2 mM) weergegeven. Zonder toegevoegd Mg^{2+} was er een geringe ATPase activiteit, waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van endogeen Mg^{2+} . Toevoegen van Mg^{2+} tot maximaal 6 mM verhoogde de ATPase activiteit; de optimale Mg^{2+} concentratie was 2 mM. Dit betekent, dat de optimale Mg^{2+} : ATP verhouding 1:1 is en dat het werkelijke substraat voor het enzym $MgATP^{2-}$ is. De toename in enzymatische activiteit door toevoegen van Mg^{2+} ionen was ongeveer viermaal.

Eenzelfde Mg^{2+} : ATP verhouding werd ook aangetoond voor de Mg^{2+} -ATPase van mycoplasma membranen (Rottem en Razin, 1966), van *Strepto-*



FIGUUR 11 Invloed van Mg^{2+} ionen op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; EDTA 0,1; ATP 2; Mg^{2+} 0,5 tot 6,0. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

coccus faecalis (Abrams c.s., 1960), van *Streptococcus pyogenes* (Sokawa, 1965) en van *Vitreoscilla* (Burnham en Hageage, 1967). Daarentegen constateerden Neujahr en medewerkers (1967) een Mg^{2+} : ATP verhouding van 1:2 voor de Mg^{2+} -ATPase van *Streptococcus faecalis*. Dezelfde enzymatische activiteit in de „ghosts” van *Bacillus megaterium* had ook deze Mg^{2+} : ATP verhouding (Weibull c.s., 1962).

Toevoeging van KCl verhoogde de Mg^{2+} -ATPase activiteit, waarbij bij lagere concentratie van de Mg^{2+} ionen (tot 1 mM) de verandering relatief het grootste was. Hierbij werd een andere maximale Mg^{2+} : ATP verhouding gevonden nl. 3:4, terwijl bij hogere concentratie van de Mg^{2+} ionen de enzymatische activiteit afnam. Deze verschuiving in maximale Mg^{2+} : ATP verhouding door toevoegen van KCl komt niet overeen met de resultaten van Neumann en Gruener (1967), die bij bonenwortels zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van 200 mM NaCl eenzelfde Mg^{2+} : ATP verhouding vonden.

IV.8 Substraatspecificiteit

De specificiteit van het enzym werd bepaald door de hydrolysesnelheid van verschillende nucleotiden te meten. In tabel VIII is het resultaat hiervan weer-

TABEL VIII Substraatspecificiteit van de phosphatase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l.

Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; substraat 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

Activiteit uitgedrukt in molen substraat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Substraat	Activiteit	
	— KCl	+ KCl
ATP	2,41	3,80
ADP	0,89	1,44
AMP	0,07	0,08
GTP	1,75	1,88
CTP	1,07	1,24
UTP	0,76	0,95
ITP	1,57	1,82
TTP	0,51	0,68

gegeven. In afwezigheid van KCl was ATP het beste substraat voor deze phosphatase. Van de verschillende triphosphaten gaven de purinenucleotiden ATP, GTP en ITP een hogere phosphatase activiteit dan de pyrimidinenucleotiden zoals CTP, UTP en TTP. Toevoegen van KCl (eindconcentratie: 140 mM) aan het incubatiemedium veroorzaakte een verhoging van de phosphatase activiteit voor alle gebruikte substraten. De grootste relatieve toename werd verkregen met ATP en ADP als substraat, waaruit we kunnen concluderen, dat ADP na ATP het beste substraat is voor deze phosphatase.

Oliver en Peel (1956) hebben in *Escherichia coli* een adenylaat kinase (ATP: AMP phosphotransferase, EC 2.7.4.3) aangetoond, waardoor ATP gevormd kan worden uit ADP. Om na te gaan of dit enzym hier mogelijk ook een rol speelt hebben wij de producten, die na de enzymatische reactie met ADP als substraat ontstaan, geanalyseerd. Daarvoor werd na de incubatie TCA toegevoegd om het eiwit te precipiteren, dat door centrifugeren verwijderd werd. De oplossing werd driemaal uitgeschud met koude aether om het zuur te verwijderen. Na elutie volgens een gewijzigde methode van Hurlbert (1954) over een kolom met Dowex 1 x 2 (formiaat-vorm) (grootte: 26 x 0,8 cm) werd duidelijk, dat behalve het niet-omgezet ADP ook ATP en AMP aanwezig waren*. Uit het feit, dat ATP gevormd wordt tijdens de enzymatische reactie volgt, dat adenylaat kinase bij de hydrolyse van ADP een rol speelt. Of ADP direct door de phosphatase gehydrolyseerd kan worden wordt hierdoor echter niet uitgesloten.

* Deze bepalingen werden uitgevoerd door Drs. E. Lommen, arts, die ik hiervoor dankbaar ben.

De resultaten, die wij voor de substratspecificiteit van de phosphatase gevonden hebben, zijn niet in overeenstemming met die van Neumann en Gruener (1967) verkregen voor het enzym uit bonenwortels. Zij constateerden alleen een activering van de phosphatase door Na^+ ionen met ATP en niet met ADP als substraat. De specificiteit voor verschillende substraten van het hier beschreven enzym is breder dan die van de phosphatase geïsoleerd uit intacte cellen van *Escherichia coli*, waar practisch eenzelfde activiteit met ATP en ADP als substraat gevonden werd (Günther en Dorn, 1966a). Hoewel wij een geringe phosphatase activiteit met AMP waargenomen hebben, werd dit substraat niet gehydrolyseerd door het enzym uit *Bacillus megaterium* (Weibull c.s., 1962). Abrams en Baron (1967) konden uit membranen van *Streptococcus faecalis* een enzym isoleren, dat na $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitatie, zonesedimentatie en polyacrylamidegel-electrophorese één enkele eiwitband vertoonde, maar niettemin ATP, GTP en ITP hydrolyseerde. In *Vitreoscilla* werd naast een ATPase ook een ADPase als een afzonderlijk enzym aangetoond (Burnham en Hageage, 1967).

IV.9 Invloed van bivalente kationen op de ATPase

Mg^{2+} blijkt een essentiële cofactor voor deze ATPase uit *Escherichia coli* te zijn. Wanneer Mg^{2+} toegevoegd werd als chloride, sulfaat of nitraat werd geen

TABEL IX Invloed van verschillende bivalente kationen op de ATPase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 8,7 in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Tris-HCl (pH 8,7) 200; bivalent kation 2; EDTA 0,1; ATP 2.

Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM. Bivalente kationen werden toegevoegd als chloride, sulfaat of nitraat.

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Kation	Activiteit	
	— KCl	+ KCl
—	0,49	0,54
Mg^{2+}	2,57	3,72
Mn^{2+}	1,97	2,75
Ca^{2+}	1,36	1,03
Cu^{2+}	0,80	0,67
Sr^{2+}	0,40	0,58
Ba^{2+}	0,58	0,71
Fe^{2+}	1,78	1,43
Co^{2+}	1,16	1,18
Ni^{2+}	0,61	0,74
Zn^{2+}	0,81	0,50

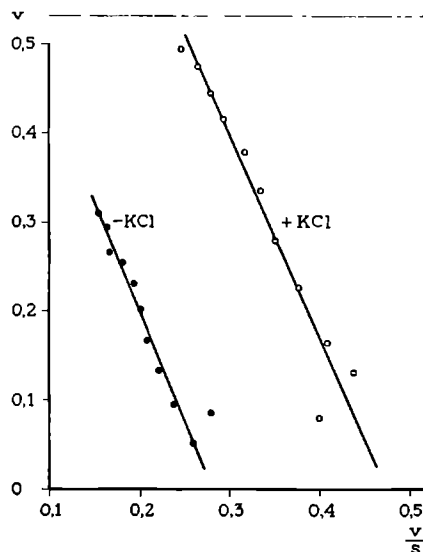
verschil in ATPase activiteit waargenomen in afwezigheid of aanwezigheid van KCl. Weliswaar hebben anionen zoals chloride, nitraat of sulfaat een zekere invloed op de ATPase activiteit (zie tabel VII), maar in dit geval werd slechts 2 mM van het desbetreffende zout toegevoegd vergeleken met 140 mM zoals in IV.6 beschreven is.

In tabel IX is de invloed van verschillende bivalente kationen als cofactor op de ATPase activiteit weergegeven. Met Mg^{2+} werd de hoogste activiteit verkregen; Fe^{2+} en vooral Mn^{2+} konden Mg^{2+} vervangen. In aanwezigheid van Ca^{2+} werd een lagere activiteit gevonden dan met Mg^{2+} als cofactor. Wanneer KCl (eindconcentratie: 140 mM) toegevoegd werd aan het incubatiemedium, werd een geheel verschillend beeld verkregen. Had KCl een duidelijk activerende invloed op de ATPase activiteit met Mg^{2+} en Mn^{2+} als cofactor, met Ca^{2+} , Fe^{2+} of Zn^{2+} was een vermindering van de enzymatische activiteit waarneembaar en met Co^{2+} had toevoeging van KCl aan het incubatiemedium geen enkele invloed. Uit deze resultaten volgt, dat Mg^{2+} de beste cofactor is voor deze ATPase uit *Escherichia coli*.

Neumann en Gruener (1967) konden aantonen, dat in het geval van bonenwortels Mg^{2+} vervangen kon worden door Ca^{2+} in afwezigheid van monovalente kationen. In aanwezigheid van NaCl of KCl was Mg^{2+} echter een betere cofactor dan Ca^{2+} . De ATPase activiteit met Cu^{2+} of Zn^{2+} als cofactor was hoger in aanwezigheid dan in afwezigheid van NaCl of KCl. Weibull en medewerkers (1962) toonden in *Bacillus megaterium* een ATPase aan, die door Ca^{2+} en Mg^{2+} in dezelfde mate gestimuleerd werd, terwijl in membranen van *Micrococcus lysodeikticus* een Ca^{2+} -geactiveerde ATPase gevonden werd (Munoz c.s., 1968).

IV.10 Reactiesnelheid van de Mg^{2+} -ATPase als functie van de substraatconcentratie

De invloed van de substraatconcentratie op de enzymatische activiteit van de Mg^{2+} -ATPase is in figuur 12 weergegeven. Hierbij werd bij toenemende concentraties ATP eveneens de Mg^{2+} concentratie verhoogd, zodat de Mg^{2+} :ATP verhouding steeds constant (1:1) was. Volgens de methode van Hofstee (1952, 1959) werd v (snelheid van de enzymatische reactie) uitgezet tegen v/s , waarna uit de helling van de verkregen lijn de K_m waarde berekend kon worden. Deze was voor de Mg^{2+} -ATPase $2,5 \times 10^{-3}$ M. Voor de Mg^{2+} -ATPase, gemeten in aanwezigheid van KCl werd een K_m waarde van $2,3 \times 10^{-3}$ M gevonden. Uit het feit, dat deze K_m waarden practisch gelijk zijn mag geconcludeerd worden, dat toevoegen van KCl aan het incubatiemedium niet de affiniteit van het enzym voor het substraat veranderde. Wel echter veranderde de reactiesnel-



FIGUUR 12 Snelheid van de hydrolyse van ATP als een functie van de concentratie van ATP bij pH 8,7 in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; EDTA 0,1; ATP 0,1 tot 2,0; Mg^{2+} 0,1 tot 2,0. Bacteriën; 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM

heid, omdat in aanwezigheid van KCl de maximale snelheid groter was dan in afwezigheid van KCl.

Voor de Mg^{2+} -ATPase van de thermophile bacterie *Bacillus stearothermophilus* werd een K_m waarde van $3,2 \times 10^{-3}$ M gevonden (Marsh en Militzer, 1956) in goede overeenstemming met de door ons gevonden waarde voor *Escherichia coli*.

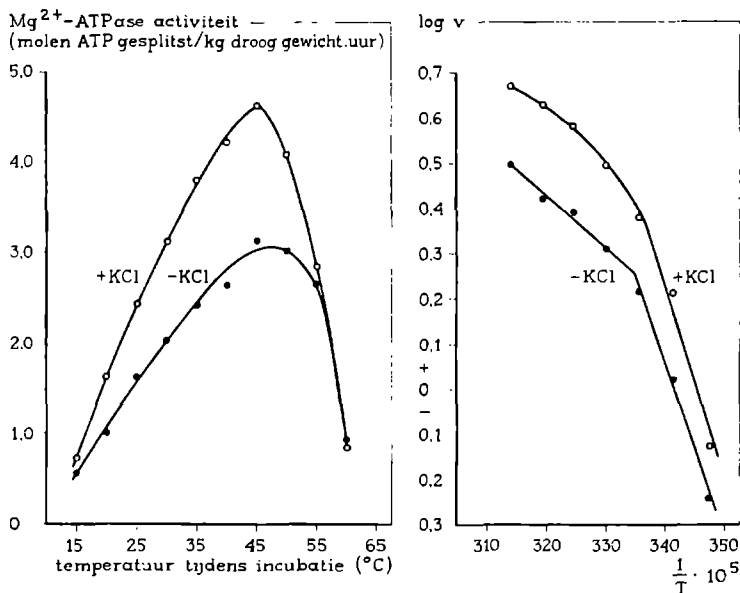
IV.11 Invloed van de temperatuur op en activeringsenergie van de Mg^{2+} -ATPase

In figuur 13a is de invloed van de temperatuur op de enzymatische reactie weergegeven. Zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van KCl werd een maximum gevonden bij 45° C. Bij hogere temperatuur nam de Mg^{2+} -ATPase sterker af in aanwezigheid dan in afwezigheid van KCl, terwijl bij 60° C de stimulerende invloed van KCl geheel verloren gegaan was.

Bij de bepaling van dit temperatuuroptimum moet rekening gehouden worden met 2 effecten, welke gelijktijdig werkzaam zijn nl. een toename van de katalytische activiteit tezamen met een denaturatie van het enzym bij hogere temperatuur, die een continue afname in de concentratie van het actief-werk-

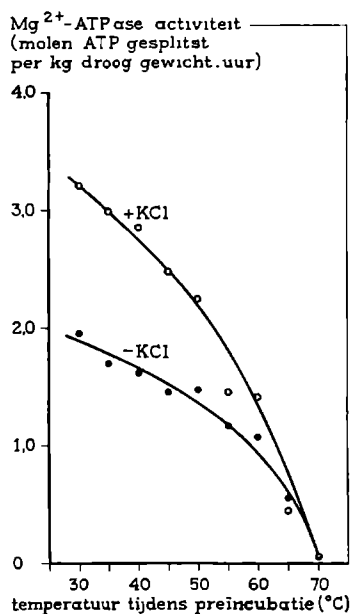
zaam enzym veroorzaakt. Het temperatuuroptimum wordt dan ook bepaald door een evenwicht tussen het effect van de temperatuur op de snelheid van de enzymatische reactie en de snelheid van de denaturatie van het enzym. Dat dit laatste hier mogelijk ook een rol speelt blijkt uit het feit, dat preïncubatie bij verschillende temperaturen de enzymatische activiteit duidelijk deed afnemen (figuur 14). Wanneer de log van de reactiesnelheid uitgezet werd als functie van $1/T$ werden voor de Mg^{2+} -ATPase twee rechten verkregen (figuur 13b). De activeringsenergie die berekend kan worden uit de helling van de lijn, was in het gebied van $15-25^{\circ}C$ 17.000 cal/mol en van $30-45^{\circ}C$ 5.700 cal/mol met een overgangstemperatuur van $26^{\circ}C$. Voor de enzymatische activiteit gemeten in aanwezigheid van KCl werd alleen tussen $15-25^{\circ}C$ een rechte lijn gevonden met een activeringsenergie van 19.000 cal/mol. Bij hogere temperatuur dan $25^{\circ}C$ werd in dit geval geen rechte lijn meer verkregen.

Dit verschijnsel van twee elkaar snijdende rechten met een bepaalde over-



FIGUUR 13a (links) Invloed van de incubatietemperatuur op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

FIGUUR 13b (rechts) Bepaling van de activeringsenergie van de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl. Voor de samenstelling van het incubatiemedium kan verwezen worden naar figuur 13a.



FIGUUR 14 Invloed van preïncubatie bij verschillende temperaturen op de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

Bacteriën werden in water gedurende 5 min bij de verschillende temperaturen geïncubeerd, voordat de enzymatische reactie gestart werd.

gangstemperatuur, waarbij de activeringsenergie van waarde verandert, is bij vele enzymen waargenomen. Er zijn enige voorbeelden van dergelijke Arrheniuscurven bekend voor de Mg^{2+} -ATPase en de (Na^+-K^+) -ATPase. Voor de Mg^{2+} -ATPase van een microsomenpreparaat uit kikvorsersenen (*Rana temporaria*) hebben Bowler en Duncan (1968) een overgangstemperatuur van 16° C verkregen, terwijl bij eenzelfde preparaat uit rattehersenen 6° en 20° C gevonden werd (Gruener en Avi-Dor, 1966). Zij hebben deze discontinuïteit voor de Mg^{2+} -ATPase en de (Na^+-K^+) -ATPase verklaard als een configuratieverandering van de polypeptideketen. Voor de Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 7,5 van chloroplasten van spinazie werd over het temperatuurgebied van 15–40° C een rechte lijn verkregen met een activeringsenergie van 11.500 cal/mol (Wessels en Baltscheffsky, 1960). Voor D-aminozuur oxidase (D-Aminoacid: oxygen oxidoreductase, EC 1.4.3.3) hebben Massey en medewerkers (1966) aangetoond, dat er een temperatuurafhankelijke transformatie was van het enzym van één stabiele vorm naar een andere bij de overgangstemperatuur. Beide

vormen waren enzymatisch actief, maar verschilden in activeringsenergie. Zij kwamen tot de conclusie, dat deze abnormale Arrhenius-curve verkregen voor andere enzymen veroorzaakt kunnen worden door eenzelfde thermisch-geïnduceerde reversibele verandering in de eiwitstructuur.

IV.12 Invloed van de ionensterkte en van verschillende buffers op de Mg^{2+} -ATPase

In tabel X is de invloed van twee verschillende buffers (Tris en AMP-1) en van de ionensterkte op de Mg^{2+} -ATPase weergegeven. Verhoging van de concentratie van Tris van 100 mM tot 200 mM gaf zonder toegevoegd KCl een geringe verhoging van de Mg^{2+} -ATPase activiteit; een verdere verhoging tot 400 mM Tris had weinig effect meer. Door toevoeging van KCl (eindconcentratie: 140 mM) werd bij een concentratie van Tris van 100, 200 of 400 mM steeds een verhoging van de enzymatische activiteit gevonden. Er trad echter wel een verlaging in de Mg^{2+} -ATPase activiteit op, wanneer in aanwezigheid van KCl de concentratie van Tris van 100 mM verhoogd werd tot 200 mM; verhoging tot 400 mM had ook in dit geval weinig effect meer. Het maakte praktisch geen verschil of hierbij chloride of bicarbonaat als anion gebruikt

TABEL X Invloed van Tris-HCl, Tris- CO_2 , AMP-1-HCl en AMP-1- CO_2 en van de ionensterkte op de Mg^{2+} -ATPase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 8,7 in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Tris-HCl of Tris- CO_2 (pH 8,7) 100, 200 of 400; AMP-1-HCl of AMP-1- CO_2 (pH 8,7) 100, 200 of 400; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2. Bacteriën: 0,125 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Buffer	Activiteit	
	— KCl	+ KCl
100 mM Tris-HCl	1,90	4,17
200 mM Tris-HCl	2,30	3,69
400 mM Tris-HCl	2,58	3,62
100 mM Tris- CO_2	2,09	4,22
200 mM Tris- CO_2	2,57	3,68
400 mM Tris- CO_2	2,60	3,37
100 mM AMP-1-HCl	1,73	2,14
200 mM AMP-1-HCl	1,26	1,65
400 mM AMP-1-HCl	0,94	1,50
100 mM AMP-1- CO_2	1,50	1,82
200 mM AMP-1- CO_2	0,83	1,23
400 mM AMP-1- CO_2	0,51	0,75

werd. Dit is in tegenstelling met de ATPase geïsoleerd uit maagmucosa van de kikvors (*Rana catesbeiana*), die gestimuleerd werd door bicarbonaat (Kasbekar en Durbin, 1965).

Bij vervanging van Tris door AMP-I trad onder alle bestudeerde omstandigheden een vermindering van de enzymatische activiteit op. De remming bij toenemende concentratie van AMP-I werd groter. Uit deze resultaten is niet te concluderen of AMP-I het enzym direct remt of dat AMP-I een complex vormt met de cofactor Mg^{2+} . Door verhoging van de concentratie van Mg^{2+} werd echter duidelijk, dat de enzymatische activiteit constant bleef, zodat de conclusie gewettigd is, dat AMP-I het enzym direct remt.

IV.13 Verdeling van de enzymatische activiteit na soniceren.

Na suspenderen van de bacteriën in water werd 3 minuten in een MSE 500-W ultrasonische desintegrator getrild, waarna een cel-vrij extract verkregen werd door centrifugeren bij $100.000 \times g$ gedurende 1 uur bij $4^\circ C$. De supernatant werd gescheiden van het precipitaat, dat opgenomen werd in een bepaalde hoeveelheid water. Hierna werd de enzymatische activiteit bepaald. Het resultaat is in tabel XI weergegeven. Door de bacteriecellen ultrasonisch te trillen werd een geringe verhoging van de Mg^{2+} -ATPase activiteit gevonden, mogelijk omdat het enzym beter voor het substraat bereikbaar was. Het grootste deel van de enzymatische activiteit was gelocaliseerd in de supernatantfractie, verkregen na centrifugeren bij $100.000 \times g$. De verhoging van de activiteit van de Mg^{2+} -ATPase door toevoeging van KCl kon alleen geconstateerd worden in intacte cellen. Blijkbaar was hiervoor de gehele integriteit van de bacteriecel belangrijk. Toevoegen van KCl remde de Mg^{2+} -ATPase activiteit

TABEL XI Mg^{2+} -ATPase activiteit bij pH 8,7 van ultrasonisch getrilde cellen van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Bacteriën werden 3 min ultrasonisch getrild en bij $100.000 \times g$ bij $4^\circ C$ gecentrifugeerd. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2.

Eiwit $\sim 110 \mu g$. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

Activiteit uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg eiwit . uur.

	Activiteit	
	— KCl	+ KCl
intacte bacteriën	2,90	4,52
getrilde bacteriën	3,48	2,81
$100.000 \times g$ supernatant	6,75	4,96
precipitaat	1,91	1,65

in de gesoniceerde cellen en in beide fracties verkregen na centrifugeren. Neumann en Gruener (1967) hebben in ruwe homogenaten van bonenwortels een activering van de Mg^{2+} -ATPase door Na^+ en K^+ ionen aangetoond. Deze activering was niet aanwezig in de mitochondriën, wel echter in de microsomen en in de supernatantfractie, verkregen na centrifugeren bij 120.000 x g.

IV.14 Discussie

In dit hoofdstuk is een uitvoerig overzicht gegeven van een aantal eigenschappen van de Mg^{2+} -ATPase van *Escherichia coli*, die door monovalente kationen gestimuleerd kan worden. Anionen blijken ook een invloed uit te oefenen. Ter vergelijking met gegevens uit de literatuur over eenzelfde enzymatische activiteit in verschillende micro-organismen wordt verwezen naar tabel XII. Hierin zijn alleen de belangrijkste eigenschappen van de Mg^{2+} -ATPase, die door monovalente kationen gestimuleerd kan worden, tezamen gebracht. Uit deze tabel blijkt, dat er een grote verscheidenheid in eigenschappen bestaat vooral wat het pH optimum, de substratspecificiteit en de stimulering door monovalente kationen betreft. Voor deze verschillen zijn enige oorzaken aan te wijzen. Niet alleen de bacteriestam maar ook het groeimedium, waarin de bacteriën gekweekt zijn, kan hierbij een rol spelen. Ook de wijze, waarop de membraan-gebonden ATPase uit de cellen vrijgemaakt wordt zal van grote invloed zijn (Neujahr c.s., 1967). Dit blijkt reeds uit het feit, dat de stimulering van de Mg^{2+} -ATPase van *Escherichia coli* door kationen door ultrasonisch trillen geheel verloren gaat. Bij dit overzicht laten wij dan nog buiten beschouwing, dat in micro-organismen ook ATPase activiteiten aangetoond zijn, waarbij Ca^{2+} of Mn^{2+} i.p.v. Mg^{2+} de beste cofactor voor optimale enzymatische activiteit kan zijn (Weibull c.s., 1962; Greenawalt c.s., 1962; Munoz c.s., 1968; Bose en Gest, 1965).

De activering van de Mg^{2+} -ATPase door monovalente kationen is door verschillende onderzoekers beschreven. Niettemin geeft geen enkele auteur aan, wat de fysiologische betekenis hiervan is. Practisch alle onderzoekers hebben deze stimulering bestudeerd om na te gaan, welke invloed Na^+ en K^+ ionen op de Mg^{2+} -ATPase hadden in verband met het transport van deze ionen door de celmembraan, hiermede dus teruggrijpend op het oorspronkelijke werk van Skou (1957) over krabbezuur. Zij komen dan tot de conclusie, dat deze ionen ieder voor zich stimulerend werken en dat mengsels van beide ionen geen synergistisch effect vertonen evenmin als ouabaine enige invloed op deze stimulering uitoefent. Hierop zal echter uitvoeriger in hoofdstuk V worden ingegaan.

Bij het uitzetten van de enzymatische activiteit tegen de concentratie van de

TABEL XII Vergelijking van Mg^{2+} -ATPasen in diverse micro-organismen.

Organisme	Optimale Mg^{2+} : ATP verhouding	Stimulering door Na^+ ionen	Stimulering door K^+ ionen	Hydrolyse van andere substraten t.o.v. ATP	pH optimum	Referentie
<i>Streptococcus faecalis</i>	1	40% bij 200 mM	40% bij 200 mM	GTP: 60% UTP: 60% CTP: 0%	8,0	Abrams c.s. (1960) Abrams (1965)
<i>Streptococcus faecalis</i>	2	geen effect bij 100 mM	maximaal bij $K^+ : Na^+ = 1:10$	ADP: 13% AMP: 0%	7,5	Neujahr c.s. (1967)
<i>Escherichia coli</i>	intacte cellen 1:5; gelyseerde protoplasten 1:50	20% bij 20-30 mM	geen effect	ADP: 94% AMP: 58%	intacte cellen: 8,5; gelyseerde protoplasten geen tot 9,2	Günther en Dorn (1966a)
<i>Bacillus megaterium</i>	2	„ghosts”: geen effect; oplosbare fractie: 25% bij 50 mM	„ghosts” geen effect; oplosbare fractie: 70% bij 50 mM	„ghosts” ADP: 0% AMP: 0% oplosbare fractie: ADP: 100% AMP: 0%	„ghosts” geen tot 8,6; oplosbare fractie: 7,5	Weibull c.s. (1962) Greenawalt c.s. (1962)
<i>Cytophaga</i> B-9 <i>Pseudomonas</i> B-16	1	100% bij ionensterkte 0,2-0,3	140% bij ionensterkte 0,2-0,3	ADP: 100% AMP: 100%	8,8	Drapeau en MacLeod (1963)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 of 100	800% bij 1400 mM*	100% bij 1400 mM*	ADP: 100% AMP: 100%	7,2 of 8,5	Hayashi en Uchida (1965)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	65% bij 60 mM	110% bij 100 mM	GTP: 70% UTP: 7% CTP: 4%	6,0	Gross en Coles (1968)
<i>Escherichia coli</i>	1	34% bij 140 mM	50% bij 140 mM	GTP: 73% UTP: 31% CTP: 44% ADP: 37% AMP: 3%	8,7	Dit onderzoek

* Bij 2 mM Mg^{2+} pH 8,5

verschillende ionen hebben wij curves verkregen, welke op de Michaelis curve voor toenemende substraatconcentratie gelijken (Figuur 10). Voor alle kationen vonden wij dan een K_m waarde van ongeveer 3×10^{-2} M. Deze waarde is een factor 10 hoger dan de K_m waarde voor de Mg^{2+} -ATPase. Hieruit volgt, dat het monovalente kation en het substraat niet samen een complex zullen vormen, dat als het werkelijke substraat voor het enzym optreedt.

De activering door monovalente kationen is ook bij andere enzymen waargenomen, zoals β -galactosidase (β -D-Galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) (Cohn en Monod, 1951), fosphaat acetyltransferase (Acetyl-CoA: orthophosphate acetyltransferase, EC 2.3.1.8) (Stadtman, 1952) en gist aldehyde dehydrogenase (Aldehyde: NAD(P) oxidoreductase, EC 1.2.1.5) (Black, 1951). Voor deze groep enzymen heeft K^+ de grootste stimulerende werking, gevolgd door Rb^+ , terwijl Na^+ en Li^+ juist remmend werken, waaruit geconcludeerd kan worden, dat K^+ en Rb^+ eenzelfde werking hebben, terwijl Na^+ en Li^+ eenzelfde, andere werking hebben. Dit is dus in tegenstelling met onze resultaten, waar juist voor alle monovalente kationen stimulering aangetoond is. Een goed voorbeeld van een enzym, waarop mono- en bivalente kationen werkzaam zijn, is pyruvaat kinase (ATP: pyruvate phosphotransferase, EC 2.7.1.40), waar voor optimale activiteit naast Mg^{2+} ionen ook K^+ , Rb^+ of Cs^+ ionen noodzakelijk zijn (Tietz en Ochoa, 1958). Uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten kunnen wij concluderen, dat in *Escherichia coli* K-12 een Mg^{2+} -ATPase aanwezig is, die door monovalente kationen gestimuleerd kan worden. De eigenschappen van deze Mg^{2+} -ATPase bemoeilijken het aantonen van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in dit micro-organisme. In hoofdstuk V zal nader ingegaan worden op de bepaling van dit enzymstelsel in *Escherichia coli*.

BEPALING VAN DE (Na⁺-K⁺)-ATPASE ACTIVITEIT EN VAN DE K/ATP VERHOUDING

V.1 Inleiding

Naast Mg²⁺ ionen zijn Na⁺ en K⁺ ionen essentieel voor (Na⁺-K⁺)-ATPase. De activiteit van dit enzymstelsel kan bepaald worden door uit het incubatiemedium voor de totale ATPase Na⁺ en/of K⁺ ionen weg te laten of ouabaine toe te voegen. Uit het verschil van de totale ATPase activiteit en de ouabaine-ongevoelige ATPase activiteit kan dan de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit berekend worden. Deze methode bleek voor zoogdierweefsels wel, voor *Escherichia coli* echter niet goed te voldoen. In dit micro-organisme konden wij een Mg²⁺-ATPase aantonen, d.w.z. een ATPase activiteit, die Mg²⁺ ionen als cofactor nodig heeft en door één enkel monovalent kation gestimuleerd kan worden. Bij de bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit volgens de boven beschreven methode zou door het weglaten van Na⁺ of K⁺ ionen uit het volledige incubatiemedium de Mg²⁺-ATPase activiteit bepaald kunnen worden, die door één enkel monovalent kation gestimuleerd wordt. Het verschil tussen de totale ATPase en de ATPase verkregen door weglaten van Na⁺ of K⁺ ionen kan dan beschouwd worden als (Na⁺-K⁺)-ATPase, maar evenzeer zou de vermindering van de activiteit het gevolg kunnen zijn van een geringere stimulering van de Mg²⁺-ATPase. In het laatste geval zou de toename van de Mg²⁺-ATPase activiteit door toevoeging van het andere kation eenvoudig het gevolg kunnen zijn van een verhoging van de totale kationenconcentratie. Om tussen beide mogelijkheden te kunnen kiezen hebben wij hierbij ook het effect van ouabaine betrokken.

V.2 Relatieve ATPase activiteiten in verschillende substraatmedia

Om een onderscheid te kunnen maken tussen de beide in de inleiding (V.1) genoemde mogelijkheden en aldus zekerheid te verkrijgen over het al of niet voorkomen van het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem in *Escherichia coli* hebben we de vijf incubatiemedia, die in hoofdstuk III gebruikt werden met een drietal media uitgebreid. Uit alle incubatiemedia volgens methode I werd CN⁻ weg-

gelaten, omdat dit geen effect op de enzymatische activiteit heeft en de concentratie van de Mg^{2+} ionen werd verhoogd van 1 tot de optimale concentratie van 2 mM. Naast een incubatiemedium met alleen Mg^{2+} ionen, substraat en buffer (medium G) werd ook een medium gebruikt, dat bovendien ouabaine (medium H) bevatte. Verder werd een incubatiemedium F gebruikt, dat bestond uit medium C (geen Na^+) waaraan ouabaine was toegevoegd. Voor een overzicht van de acht incubatiemedia kan verwezen worden naar tabel I.

De resultaten verkregen met deze acht media zijn in tabel XIII verwerkt. De totale ATPase activiteit (medium A) is op 100 % gesteld. Met medium G, waarin alleen Mg^{2+} ionen aanwezig waren, werd de niet-gestimuleerde Mg^{2+} -ATPase activiteit bepaald. Deze bedroeg 83,8 % van de totale ATPase. Ouabaine (medium H) had daarop geen invloed (83,8 %, $P > 0,1$). Door toevoegen van het Na^+ (medium B) werd de Mg^{2+} -ATPase significant verhoogd tot 91,5 % van de totale ATPase activiteit ($P < 0,001$). Deze stimulerende werking van Na^+ ionen op de Mg^{2+} -ATPase activiteit werd reeds in hoofdstuk IV beschreven. Ook hier werd geen significante invloed van ouabaine gevonden

TABEL XIII Relatieve ATPase activiteiten van *Escherichia coli* in verschillende substraatmedia.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode II (tabel I).

Bacteriën: 0,125 mg.

Activiteit uitgedrukt als percentage van de totale ATPase activiteit.

Medium code	Incubatiemedia				ATPase activiteit %	
	Mg^{2+}	Na^+	K^+	ouabaine ($10^{-4}M$)		
A	+	+	+	—	100	(21)
B	+	+	—	—	91,5 ± 0,9	(21)
C	+	—	+	—	92,6 ± 0,8	(8)
D	+	+	+	+	93,1 ± 1,0	(21)
E	+	+	—	+	91,9 ± 0,5	(21)
F	+	—	+	+	92,0 ± 0,5	(8)
G	+	—	—	—	83,8 ± 0,7	(21)
H	+	—	—	+	83,8 ± 0,7	(21)

Activiteit aangegeven als gemiddelde met standaardfout en tussen haakjes het aantal bepalingen.

Verschillen tussen medium A en ieder van de andere media zijn significant ($P < 0,001$).

Verschillen tussen medium G en H enerzijds en ieder van de andere media anderzijds zijn significant ($P < 0,001$).

Verschillen tussen media G en H en tussen media B, C, D, E en F zijn niet significant ($P > 0,1$).

Gemiddelde absolute activiteit in medium A: $3,04 \pm 0,08$ molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

(medium B 91,5 % tegen medium E 91,9 %, $P > 0,1$). K^+ ionen in afwezigheid van Na^+ ionen hebben eveneens een stimulerende invloed op de Mg^{2+} -ATPase activiteit (hoofdstuk IV), hetgeen ook hier duidelijk wordt, omdat de enzymatische activiteit verkregen met medium C als incubatiemedium 92,6 % bedroeg t.o.v. medium A, hetgeen significant hoger is dan de activiteit in medium G ($P < 0,001$). De invloed van ouabaine op deze stimulering van de Mg^{2+} -ATPase door K^+ ionen was niet significant (medium C 92,6 % tegen medium F 92,0 %, $P > 0,1$). Wanneer echter ouabaine aan het medium voor de totale ATPase werd toegevoegd, verminderde de enzymatische activiteit tot 93,1 %. Deze vermindering ten opzichte van de totale ATPase was significant ($P < 0,001$). De activiteiten in media B (geen K^+ ionen), C (geen Na^+ ionen) en D (+ ouabaine) vertoonden geen significante verschillen.

Zoals wij reeds in de inleiding van dit hoofdstuk gesteld hebben, kan de mogelijkheid bestaan van een additief effect van Na^+ en K^+ ionen tezamen op de door één enkel kation gestimuleerde Mg^{2+} -ATPase. De hogere activiteit in medium A (totale ATPase) vergeleken met die in medium B (geen K^+ ionen) en medium C (geen Na^+ ionen) zou dan niet berusten op de aanwezigheid van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. Deze mogelijkheid kan echter uitgesloten worden op grond van de gelijke activiteitsvermindering door ouabaine (medium D) en de afwezigheid van een ouabaine effect in medium E (t.o.v. B), F (t.o.v. C), H (t.o.v. G). De conclusie is dus gewettigd, dat deze stimulering van de beide kationen de werkelijke ouabaine-gevoelige, (Na^+-K^+) -afhankelijke ATPase representeert en dat dit enzymesysteem dus aanwezig is in *Escherichia coli*. Aangezien er geen significante verschillen zijn tussen de activiteiten in de media B, C, D, E en F is ieder van deze media bruikbaar voor de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit. De beste maat voor deze bepaling is het verschil in medium A en het gemiddelde van de media B, C, D, E en F. In *Escherichia coli* bedraagt dit verschil 7,8 % van de totale ATPase activiteit.

De verschillen in activiteit tussen medium A en de media B, C, E en F worden niet veroorzaakt door weglaten van chloride uit het incubatiemedium, aangezien dezelfde resultaten verkregen werden met bromide of sulfaat i.p.v. chloride. Daarom kan een invloed van het anion in deze relatief lage concentratie uitgesloten worden. Deze resultaten komen overeen met die van Opit en medewerkers (1966), die geen invloed vonden van chloride, bromide of sulfaat op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van enige organen van cavia's.

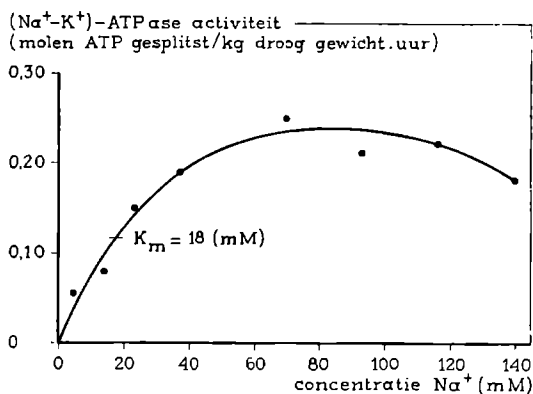
De absolute totale ATPase activiteit is $3,04 \pm 0,08$, van de Mg^{2+} -ATPase $2,54 \pm 0,08$ en van de (Na^+-K^+) -ATPase $0,24 \pm 0,03$, alle uitgedrukt in molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur (21 bepalingen). De totale ATPase activiteit is hoger dan die in hoofdstuk III.3 gegeven is, omdat hier een Mg^{2+} concentratie van 2 mM in plaats van 1 mM gebruikt werd.

Bij deze experimenten werd steeds gebruik gemaakt van gelyophiliseerde, intacte bacteriecellen, waardoor de mogelijkheid van een afbraak van ouabaine tijdens de incubatie van één uur bij 37° C aanwezig was. Om deze mogelijkheid te onderzoeken werd na een normale incubatie de reactie niet gestopt door toevoegen van TCA, maar werden de bacteriën direct door centrifugeren gesedimenteerd. De zo verkregen supernatant werd gebruikt als incubatiemedium voor een bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit met rattenier als enzymbron. Uit de hierbij optredende remming bleek dat de bacteriecellen tijdens de incubatie ouabaine volledig intact lieten.

V.3 Invloed van Na⁺ ionen op de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit

In III.6 is reeds de afhankelijkheid van de (Na⁺-K⁺)-ATPase ten opzichte van een toenemende concentratie K⁺ ionen aangegeven. De Na⁺-activeringscurve d.w.z. de afhankelijkheid van de (Na⁺-K⁺)-ATPase ten opzichte van de concentratie Na⁺ ionen in aanwezigheid van een constante concentratie K⁺ ionen (5 mM) is in figuur 15 weergegeven. Hierbij werd een maximale activering bij 60–100 mM Na⁺ gevonden, terwijl de K_m waarde bij 18 mM Na⁺ lag.

In het algemeen worden in verschillende weefsels voor de Na⁺-activering een hogere concentratie voor maximale activering en een hogere K_m waarde gevonden dan voor de K⁺-activering. Dit blijkt ook uit verschillende literatuurgegevens. Bakkeren en Bonting (1968a) hebben aangetoond, dat voor rattelever bij 5 mM K⁺ maximale activering bij 40 mM Na⁺ verkregen werd en de



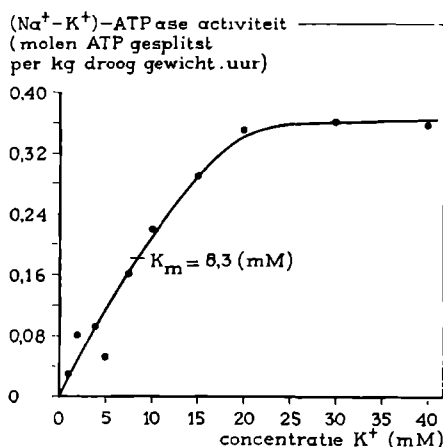
FIGUUR 15 Invloed van Na⁺ ionen op de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 7,5) 98; K⁺ 5; Mg²⁺ 2; EDTA 0,1; ATP 2; Na⁺ 5 tot 140. Bacteriën: 0,125 mg.

K_m waarde 6,0 mM was. Deze laatste waarde lag voor de zoutklier van de zilvermeeuw bij 12,5 mM (Bonting c.s., 1964b) en bij 11,7 en 13,5 mM voor de rectale klier van twee soorten elasmobranchi (Bonting, 1966). Voor de (Na^+-K^+) -ATPase van varkensretina werd bij een concentratie van K^+ ionen van 6 mM voor de Na^+ -activering een K_m waarde van 2 mM gevonden (Frank en Goldsmith, 1965). Voor een lichte microsomale suspensie van rattenieren werd bij 5 mM K^+ een maximale activering bij 50 mM Na^+ gevonden met een K_m waarde van 16 mM (Katz en Epstein, 1967). De door ons gevonden waarden voor *Escherichia coli* wijken dus niet sterk af van die voor zoogdierweefsels.

V.4 Invloed van K^+ ionen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit

Onder dezelfde omstandigheden, waaronder de Na^+ -activeringscurve geme-ten is, hebben wij de invloed van een toenemende concentratie K^+ ionen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit bepaald. Ook nu werd, evenals in hoofdstuk III.6 beschreven is, een maximale activering verkregen bij 20–40 mM K^+ , terwijl de K_m waarde nu 8,3 mM was (figuur 16). Wanneer de K^+ -activeringscurve be- paald werd na voorbehandelen van de bacteriën met ureum en in aanwezigheid van 1 mM Mg^{2+} werd een K_m waarde van 4,3 mM gevonden (figuur 5).



FIGUUR 16 Invloed van K^+ ionen op de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: Tris-HCl (pH 7,5) 94; Na^+ 60; Mg^{2+} 2; EDTA 0,1; ATP 2; K^+ 1 tot 40. Bacteriën: 0,125 mg.

V.5 Invloed van erythrophleine en scillareen A op de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit

Naast ouabaine zijn nog een aantal andere verbindingen bekend, die de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit remmen. Een groep van deze verbindingen behoort tot de alkaloiden en bezit dezelfde farmacologische eigenschappen als de hartglycosiden, maar heeft een andere chemische structuur. Zij komen voor in de schors, de bladeren en de zaden van het geslacht *Erythrophleum*. Tot deze groep behoren erythrophleine en cassaine. Deze remmen de (Na⁺-K⁺)-ATPase van hersenen en nieren van konijnen evengoed als ouabaine (Bonting c.s., 1964c). Op de Mg²⁺-ATPase hebben deze remmers geen invloed. De remcurves voor erythrophleine en ouabaine hebben eenzelfde vorm, zoals voor de (Na⁺-K⁺)-ATPase van rattelver is aangetoond, waarbij opvalt, dat de pI waarde voor half-maximale remming voor erythrophleine hoger is dan voor ouabaine, hetgeen betekent, dat erythrophleine een meer effectieve remmer is dan ouabaine (Bakkeren en Bonting, 1968a). Ook het hartglycoside scillareen A remt de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit, zoals Vates en medewerkers (1964) voor de plexus chorioïdeus van de kat aangetoond hebben.

Wij hebben nagegaan of de (Na⁺-K⁺)-ATPase van *Escherichia coli* ook door erythrophleine of scillareen A geremd kon worden. Zoals uit tabel XIV blijkt, heeft erythrophleine (10⁻⁴ M) geen effect op de (Na⁺-K⁺)-ATPase van dit micro-organisme. Scillareen A is niet in water oplosbaar en werd daarom in 80% methanol opgenomen. Door verdunning was de eindconcentratie van het methanol in het incubatiemedium 0,8%. Deze concentratie was echter al voldoende om de (Na⁺-K⁺)-ATPase grotendeels te remmen, zodat de invloed van scillareen A hierop niet nagegaan kon worden.

TABEL XIV Invloed van ouabaine en erythrophleine op de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit van *Escherichia coli*.

De bepaling werd uitgevoerd volgens methode II met medium A (totale ATPase activiteit). Aan het incubatiemedium werd ouabaine of erythrophleine (10⁻⁴M) toegevoegd. Bacteriën: 0,125 mg.

Activiteit uitgedrukt als percentage van de totale ATPase activiteit.

Medium	ATPase activiteit (%)
A	100 (4)
A + ouabaine	92,0 ± 1,0 (4)
A + erythrophleine	99,3 ± 1,2 (4)

Activiteit aangegeven als gemiddelde met standaardfout en tussen haakjes het aantal bepalingen.

Gem. absolute activiteit van medium A: 2,83 ± 0,29 molen ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur.

V.6 Berekening van de K/ATP verhouding

Voor het transport van Na^+ en K^+ ionen tegen de electrochemische gradiënt in is energie nodig, welke geleverd wordt door hydrolyse van ATP door het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. Door vrijkomende energie bij de hydrolyse van ATP tot ADP en P_i wordt de cel dus in staat gesteld een aantal K^+ ionen op te nemen en Na^+ ionen af te geven. Met membranen van erythrocyten zijn uitgebreide onderzoeken gedaan naar het aantal Na^+ of K^+ ionen, dat getransporteerd wordt per molecuul ATP gehydrolyseerd door het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. Hierbij werd gevonden, dat ongeveer 3 Na^+ ionen afgegeven en 2 K^+ ionen opgenomen worden per molecuul ATP gesplitst, waaruit een K/ATP of Na/ATP verhouding van 2-3 resulteert (Glynn, 1962b; Gardos, 1964; Sen en Post, 1964 en Whittam en Ager, 1965). Bonting en Caravaggio (1963) hebben in zes weefsels, waarvan de absolute waarde van de kationenflux bekend was, de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit bepaald en uit deze beide gegevens de kation/ATP verhouding berekend. Het bleek toen, dat er een zeer goede correlatie tussen de flux en de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanwezig was over een 25.000-voudig meetgebied met een gemiddelde verhouding van $2,56 \pm 0,19$. Andere weefsels, waarvoor deze verhouding bepaald kon worden, zijn samengevat door Bonting (1966).

Wij hebben dezelfde benaderingswijze gevolgd voor de berekening van de K/ATP verhouding in *Escherichia coli*. Hierbij is als activiteit voor de (Na^+-K^+) -ATPase genomen: 0,24 mol ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur (vergelijk V.2). Voor de gemiddelde K^+ influx in *Escherichia coli* onder „steady state” voorwaarden werd 1 tot 2 pmol/cm². sec gevonden (Schultz c.s., 1962). Bij een osmolaliteit van 270 mOsm voor het groeimedium is de verhouding van het droog gewicht tot het nat gewicht gelijk aan 0,285 (Epstein en Schultz, 1965), terwijl het membraanoppervlak gelijk is aan $6,8 \times 10^4$ cm²/ml bacteriën (Schultz c.s., 1963). Voor een opname van 1 pmol/cm². sec bedraagt het aantal K^+ ionen dat per kg droog gewicht per uur opgenomen wordt:

$$\frac{100}{28,5} \times 6,8 \times 10^4 \times 3600 = 0,86 \text{ mol/kg droog gewicht . uur.}$$

Bij een K^+ influx van 1 tot 2 pmol/cm². sec worden dus 0,86 tot 1,72 mol kalium/kg droog gewicht . uur opgenomen. Van deze K^+ influx komt slechts 40% op rekening van de K^+-Na^+ uitwisseling en de rest representeert K^+-H^+ uitwisseling (Schultz c.s., 1963). Dit zou betekenen, dat de opname van tegen Na^+ uitgewisseld K^+ 0,34 tot 0,68 mol kalium/kg droog gewicht . uur bedraagt.

Dit levert voor de K/ATP verhouding een waarde van: $\frac{0,34}{0,24}$ tot $\frac{0,68}{0,24}$ of 1,4 tot 2,8. Deze waarden komen overeen met de Na/ATP of K/ATP verhou-

TABEL XV Verhouding van natriumtransport tot hydrolyse van ATP in verschillende weefsels.

Weefsel	Na/ATP (Eq/mol)	Referentie
menselijke erythrocyten	2,8	Bonting en Caravaggio (1963)
teenspier van de kikker	1,9	Bonting en Caravaggio (1963)
reuze-axon van de pijl-inktvis	3,0 (K)	Bonting en Caravaggio (1963)
kikkerhuid	3,0	Bonting en Caravaggio (1963)
electrisch orgaan van de sidderaal	2,2	Bonting en Caravaggio (1963)
paddeblaas	2,4	Bonting en Canady (1964)
kalfslens	3,1	Bonting c.s. (1963)
zoutklier van de zilvermeeuw	2,0	Bonting (1966)
menselijke leucocyten	1,8	Block en Bonting (1964)
<i>Escherichia coli</i>	1,4-2,8 (K)	Dit onderzoek

dingen, welke door Bonting en medewerkers gevonden zijn (tabel XV). De onzekerheid in het getal 1,4-2,8 ligt, zoals uit het bovenstaande volgt, grotendeels in de moeilijkheid exact de K^+ influx te bepalen, welke door Schultz c.s. (1962) met een verschil van 100% aangegeven is. Niettemin blijft de goede overeenkomst van de K/ATP verhouding met die van een aantal verschillende weefsels bestaan, hetgeen een nadere bevestiging is van de door ons bepaalde (Na^+-K^+) -ATPase activiteit.

V.7 Discussie

Nadat wij in hoofdstuk III beschreven hadden, dat er in *Escherichia coli* een (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanwezig is, hebben wij in hoofdstuk IV een aantal eigenschappen bepaald van een Mg^{2+} -ATPase, die door één enkel monovalent kation gestimuleerd kan worden. Dit leidde tot de vraag of werkelijk (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in dit micro-organisme aanwezig is, omdat een mogelijk additief effect van Na^+ en K^+ ionen op de door één enkel monovalent kation gestimuleerde Mg^{2+} -ATPase zou kunnen bestaan. Daarom hebben wij de remming van de totale ATPase door ouabaine in ons onderzoek centraal gesteld. Ouabaine had geen invloed op de Mg^{2+} -ATPase activiteit noch op de door één enkel monovalent kation gestimuleerde Mg^{2+} -ATPase activiteit. Alleen wanneer Mg^{2+} , Na^+ en K^+ ionen tezamen in het incubatiemedium aanwezig waren, remde ouabaine een deel van de enzymatische activiteit, zodat we mogen concluderen hier met de (Na^+-K^+) -geactiveerde, ouabaine-gevoelige ATPase activiteit te doen te hebben. Uit het feit dat ouabaine wel een remmende werking

op deze totale ATPase activiteit, doch niet op de Mg^{2+} -ATPase activiteit met of zonder één monovalent kation heeft, kan geconcludeerd worden, dat de activering door toevoegen van K^+ ionen aan het Na^+ -houdend medium of van Na^+ ionen aan het K^+ -houdend medium niet eenvoudig het gevolg is van een verhoging van de totale kationenconcentratie. De relatieve (Na^+-K^+) -ATPase activiteit, berekend uit het verschil van medium A en het gemiddelde van de media B, C, D, E en F, bedroeg 7,8 % van de totale ATPase activiteit.

Hoewel de absolute activiteit van de (Na^+-K^+) -ATPase (0,24 mol/kg droog gewicht . uur) niet zo gering was in vergelijking met vele andere weefsels (zie b.v. Bonting c.s., 1961), was de praktische moeilijkheid gelegen in de geringe percentuele activiteit van de (Na^+-K^+) -ATPase en in de stimulering van de Mg^{2+} -ATPase door één enkel monovalent kation.

Voor de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit werd in aanwezigheid van 2 mM ATP steeds 2 mM Mg^{2+} gebruikt, omdat dit de optimale verhouding 1:1 levert (III.5). Ook de concentratie van Na^+ ionen was praktisch optimaal, zoals uit de Na^+ -activeringscurve (figuur 15) blijkt. De concentratie van de K^+ ionen was echter niet optimaal. Wij hebben de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit steeds gemeten bij een concentratie van 5 mM K^+ d.w.z. een concentratie, die bij de K_m waarde (4,3–8,3 mM), maar beneden de optimale concentratie (20–40 mM) lag. Als overweging hiervoor hebben wij laten gelden, dat K^+ ionen een grote activerende werking op de Mg^{2+} -ATPase hebben en een antagonistische werking uitoefenen op de remming door ouabaine (Bonting c.s., 1964c). Dit laatste betekent, dat bij een constante concentratie van ouabaine de remming van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit door ouabaine opgeheven kan worden door de concentratie van de K^+ ionen te verhogen. Bij de bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit in *Escherichia coli* hebben wij steeds 10^{-4} M ouabaine gebruikt. Een honderdvoudige verhoging van de concentratie (10^{-2} M) veroorzaakte geen grotere remming. Blijkbaar was de concentratie van ouabaine (10^{-4} M) al voldoende om onder deze experimentele omstandigheden volledige remming van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit te geven.

De Na^+ -activeringscurve en de K^+ -activeringscurve werden bepaald in aanwezigheid van respectievelijk 5 mM K^+ en 60 mM Na^+ . Wanneer de Na^+ -activeringscurve bij pH 7,5 gemeten werd in afwezigheid van K^+ ionen, werd maximale stimulering bij 80–100 mM gevonden met een K_m waarde van 33 mM. K^+ ionen gaven in afwezigheid van Na^+ ionen een maximale stimulering bij 100–120 mM met een K_m waarde van 18 mM. De K_m waarde voor de Na^+ -activering wordt kleiner (18 i.p.v. 33 mM), wanneer deze bepaald wordt in aanwezigheid van K^+ ionen, hetgeen ook geldt voor de K_m waarde van de K^+ -activering in aanwezigheid van Na^+ ionen (8,3 i.p.v. 18 mM). Door toevoegen van het tweede monovalente kation wordt de K_m waarde dus verlaagd,

hetgeen inhoudt dat de affiniteit van het enzym voor het substraat verhoogd wordt. De mogelijkheid, dat de door één enkel monovalent kation geactiveerde Mg^{2+} -ATPase een invloed heeft op deze bepalingen van de K^{+} - en Na^{+} -activeringscurve kan echter niet uitgesloten worden. De K^{+} -activering, gemeten in aanwezigheid van 1 mM Mg^{2+} en na voorbehandelen van de bacteriën met ureum leverde een K_m waarde van 4,3 mM op (figuur 5), terwijl zonder deze voorbehandeling en in aanwezigheid van 2 mM Mg^{2+} de K_m waarde 8,3 mM was (figuur 16). Omdat Bakkeren en Bonting (1968a) weinig invloed van ureum op de kinetische parameters van $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase vonden, zouden we de verhoging van de Mg^{2+} ionen concentratie tot de optimale verhouding ten opzichte van de hoeveelheid gebruikte ATP (1:1) voornamelijk verantwoordelijk willen stellen voor de verminderde affiniteit van het enzymstelsel voor K^{+} ionen.

Verschillende onderzoekers o.a. Günther en Dorn (1966a), Gross en Coles (1968) en Drapeau en MacLeod (1963) hebben geprobeerd $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase in bacteriën aan te tonen, maar zij zijn er niet in geslaagd. Wij menen echter op grond van onze resultaten te mogen stellen dat dit enzymstelsel, dat in vele dierlijke weefsels aangetoond is, ook in *Escherichia coli* aanwezig is, zij het in relatief lage activiteit.

Het aantonen van $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase is één benaderingswijze van het transportsysteem in *Escherichia coli*. Een tweede mogelijkheid om dit te bestuderen is het instellen van een onderzoek naar de invloed van ouabaine op het natrium- en kaliumgehalte van de cellen. Hierover handelt het volgende hoofdstuk.

NATRIUM- EN KALIUMGEHALTE

VI.1 Inleiding

Cellen bevatten in het algemeen een hoog kaliumgehalte en een laag natriumgehalte, terwijl het omgekeerde geldt voor de extracellulaire vloeistof. Als gevolg van dit grote concentratieverschil zullen K^+ ionen de cel uitlekken en Na^+ ionen de cel ingaan, waardoor het concentratieverschil tussen intra- en extracellulaire ruimte kleiner zal worden. Wanneer echter de cel dit grote concentratieverschil tussen beide compartimenten wil handhaven, zullen K^+ ionen naar binnen en Na^+ ionen naar buiten gepompt moeten worden. Aangezien dit transport tegen een electrochemische gradiënt ingaat, is hiervoor energie nodig, welke geleverd wordt door de hydrolytische splitsing van ATP tot ADP en Pi. In I.5 is reeds uitvoerig ingegaan op het feit, dat in dierlijke weefsels het (Na^+-K^+) -ATPase systeem nauw verbonden is met het transport van Na^+ en K^+ ionen via de celmembraan.

Ouabaine remt zowel het transport van Na^+ en K^+ ionen als het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. Wanneer aan cellen met een normaal transportsysteem ouabaine toegevoegd wordt, zal het hoge intracellulaire kaliumgehalte zich niet meer kunnen handhaven ten opzichte van het lage extracellulaire kaliumgehalte, waardoor K^+ ionen uit de cel zullen lekken; het resultaat is dan ook dat het intracellulaire kaliumgehalte daalt. Daarentegen zullen Na^+ ionen de cel ingaan, omdat door remming van de kationenpomp door ouabaine Na^+ ionen niet meer de cel uitgepompt worden en daardoor steeds meer Na^+ ionen vanuit het extracellulaire medium de cel binnen zullen gaan. Dit betekent dus, dat het intracellulaire natriumgehalte verhoogd wordt. Ouabaine heeft zo een tweezijdig effect: het verhoogt het intracellulaire natriumgehalte en het verlaagt het intracellulaire kaliumgehalte.

Het meest oorspronkelijke werk in dit verband is van Schatzman (1953), die kon aantonen, dat het transport van Na^+ en K^+ ionen via de membranen van erythrocyten door ouabaine geremd wordt. Ook andere hartglycosiden, zoals scillareen A, hebben eenzelfde werking (Glynn, 1957). Veel van dit type experimenten zijn uitgevoerd met coupes van organen, o.a. met hersencortex van cavia's (Swanson en McIlwain, 1965; Yoshida c.s., 1961). Ook met coupes van hersencortex van katten werd eenzelfde effect van ouabaine gevonden (Bourke en Tower, 1966).

Nadat duidelijk was geworden, dat in *Escherichia coli* (Na^+ - K^+)-ATPase activiteit aanwezig is, hebben wij geprobeerd de correlatie van dit enzymstelsel met het transport van de kationen na te gaan. Daartoe hebben wij met *Escherichia coli* soortgelijke experimenten uitgevoerd als door bovengenoemde auteurs beschreven is. Bacteriën werden in de logarithmische groeifase geoogst en vervolgens geënt in een vers groeimedium, waaraan ouabaine (10^{-4} M) toegevoegd was. Nadat de bacteriën nog ongeveer 1,5 uur gekweekt waren, werden ze opnieuw geoogst, tweemaal uitgewassen met dubbel-gedestilleerd water en gelyophiliseerd. Ter controle werden bacteriën uit dezelfde kweek op gelijke wijze behandeld in afwezigheid van ouabaine. Na destructie van het droge materiaal werd met behulp van een vlamfotometer het natrium- en kaliumgehalte bepaald. Om de specifieke invloed van ouabaine te kunnen vaststellen hebben wij daarnaast nog het effect van enige metabolische remmers en van het weglaten van glucose uit het groeimedium op het natrium- en kaliumgehalte nagegaan.

Zoals boven reeds beschreven is, werden de bacteriën na oogsten tweemaal met dubbel-gedestilleerd water uitgewassen om zoveel mogelijk het groeimedium te verwijderen. Epstein en Schultz (1965) hebben geconstateerd, dat wassen van bacteriecellen met oplossingen van lage osmolaliteit resulteert in een vermindering van het intracellulaire kaliumgehalte. Eveneens hebben zij aangetoond, dat wassen met verdunde NaCl oplossing een groter verlies van kalium veroorzaakte dan wassen met gedestilleerd water. Hoewel ook in onze experimenten door het uitwassen met gedestilleerd water zeker het intracellulaire kaliumgehalte gedaald zal zijn, hebben wij gemeend toch bovenstaande procedure te kunnen volgen, omdat voor ons onderzoek het effect van de verschillende remstoffen op het kationengehalte van belang was en niet de absolute waarde van het intracellulaire natrium- en kaliumgehalte.

VI.2 Groei van de bacteriën

De bacteriën werden na oogsten in de logarithmische groeifase opnieuw in een vers groeimedium geënt, waarna nog ongeveer 1,5 uur gekweekt werd. Hierbij bleek, dat de aanwezigheid van ouabaine, DNP of NaF in het groeimedium geen remming van de groei tot gevolg had. Door het weglaten van glucose was na 1,5 uur een geringe verlaging en door toevoegen van NaCN een geringe verhoging van de celdichtheid waar te nemen. Dat ouabaine geen invloed op de groei van de bacteriën had was vooral belangrijk voor de bepaling van de invloed van deze remstof op het natrium- en kaliumgehalte. Bij de toename van het aantal bacteriecellen gedurende de logarithmische groeifase neemt het intracellulaire kaliumgehalte af, terwijl het natriumgehalte toeneemt

(Schultz en Solomon, 1961). Omdat echter ouabaine onder deze experimentele omstandigheden geen invloed op de groeisnelheid van de bacteriën had, hebben wij daaruit geconcludeerd, dat de eventueel te meten veranderingen in natrium- en kaliumgehalte van de cellen niet veroorzaakt werden door een verschil in het groeistadium van de bacteriën, maar dat ouabaine een directe invloed had op de kationenconcentraties.

VI.3 Bepaling van het natrium- en kaliumgehalte

In tabel XVI zijn de resultaten verwerkt, welke verkregen werden na het bepalen van het natrium- en kaliumgehalte. De waarden verkregen met het normale medium werden op 100% gesteld. In aanwezigheid van ouabaine (10^{-4} M) nam het natriumgehalte toe tot 114,7%, terwijl het kaliumgehalte daalde tot 92,6%. Weliswaar waren deze effecten niet groot, maar niettemin waren ze significant. Bij het weglaten van glucose werd eenzelfde effect waar-

TABEL XVI Invloed van verschillende remmers en weglaten van glucose op het natrium- en kaliumgehalte van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het groeimedum in mmol/l:

NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; KCl 5; pH 7,0. Eindconcentratie glucose: 60.

Natriumgehalte en kaliumgehalte uitgedrukt als percentage van de controlewaarde met standaardfout en tussen haakjes het aantal bepalingen.

Remmer (10^{-4} M) of weglaten van glucose	Natriumgehalte %	Kaliumgehalte %
1 -	100	100 (14)
2 ouabaine	114,7 \pm 4,1	92,6 \pm 2,5 (14)
3 DNP	106,1 \pm 5,6	96,3 \pm 5,4 (9)
4 NaF	120,2 \pm 7,7	103,3 \pm 5,9 (9)
5 NaCN	188,3 \pm 16,2	94,4 \pm 7,1 (9)
6 zonder glucose	192,1 \pm 20,0	48,6 \pm 5,2 (9)
Verskil 1-2	P = 0,004	P = 0,011
1-3	P = 0,31	P = 0,51
1-4	P = 0,031	P = 0,59
1-5	P < 0,001	P = 0,49
1-6	P = 0,0018	P < 0,001

Gem. absolute waarde van het natriumgehalte van de controle: 0,114 \pm 0,010 eq/kg droog gewicht.

Gem. absolute waarde van het kaliumgehalte van de controle: 0,165 \pm 0,015 eq/kg droog gewicht.

genomen als in aanwezigheid van ouabaine, d.w.z. verhoging van het natriumgehalte en vermindering van het kaliumgehalte; het effect was echter veel groter. Toevoegen van DNP had geen enkele invloed op het kationengehalte, terwijl NaF en NaCN wel het natriumgehalte significant verhoogden, maar geen merkbare invloed hadden op het kaliumgehalte.

Elshove en van Rossum (1963) hebben een uitvoerig onderzoek gedaan over het kationentransport in coupes van rattelever en de invloed van een aantal remmers daarop. Het transport van Na^+ en K^+ ionen werd door ouabaine duidelijk geremd, terwijl eveneens een remming van de ademhaling plaats vond. CN^- (1 mM) gaf een maximale remming van de kaliumopname en de ademhaling, waarbij bleek, dat bij een gegeven remming van de ademhaling ouabaine een betere remmer was voor de kaliumopname dan CN^- . Een maximale remming van de kationbewegingen werd waargenomen met 2×10^{-4} M DNP, waarbij echter geen significante invloed op de ademhaling van coupes van rattelever gevonden werd.

De resultaten, welke wij met *Escherichia coli* verkregen hebben, zijn moeilijk te vergelijken met die van dierlijke weefsels, zoals coupes van ratteleveren. De diverse remmers werden steeds toegevoegd aan een medium, waarin groeiende cellen aanwezig waren. De remmers zouden dus kunnen ingrijpen op de celdeling en groei, terwijl bij experimenten met dierlijke weefsels *in vitro* uiteraard van een dergelijk proces geen sprake is. Schultz en Solomon (1961) constateerden voor *Escherichia coli*, dat zonder glucose de kaliumopname en de natriumafgifte 70% geremd werden; joodazijnzuur (10^{-3} M) en DNP (10^{-4} M) remden beide processen volledig. NaCN (10^{-3} M) had geen enkele invloed op het natrium- en kaliumtransport, terwijl NaF (10^{-2} M) wel de natriumafgifte, maar niet de kaliumopname remde. Een volledige vergelijking met onze resultaten is niet geheel mogelijk, omdat Schultz en Solomon (1961) de bacteriën 30 minuten geïncubeerd hebben in aanwezigheid van de diverse remmers, voordat de cellen geresuspendeerd en gedurende 1 uur bij 37°C geïncubeerd werden in een vers groeimedium, waarna het natrium- en kaliumgehalte gemeten werd. Wij hebben echter beide bepaald in cellen zonder deze na incubatie met de diverse remmers opnieuw in een vers groeimedium te incuberen. Onze resultaten kunnen beter vergeleken worden met die van Günther en Dorn (1966b), waarbij voor *Escherichia coli* in aanwezigheid van glucose een remming van de kaliumopname van 45% door DNP (10^{-3} M) gevonden werd, terwijl andere metabolische remmers, zoals NaN_3 , NaF en KCN evenals ouabaine in dezelfde concentratie geen invloed hadden op het kaliumtransport. Wij hebben echter met ouabaine een significante verlaging ($P = 0,011$) van het kaliumgehalte en een significante verhoging ($P = 0,004$) van het natriumgehalte geconstateerd. Aan nemend dat ouabaine geen invloed heeft op de lek van deze ionen kunnen we

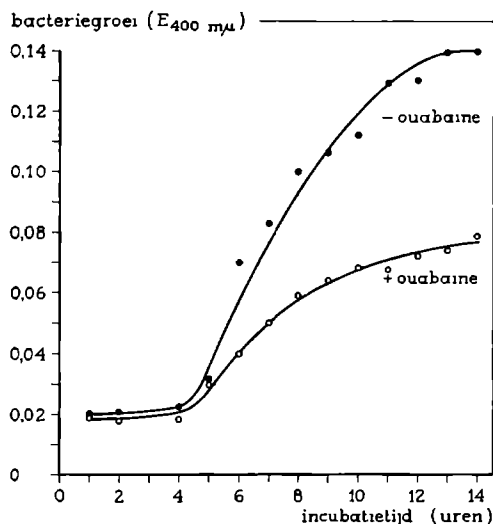
hieruit concluderen, dat het transport van Na^+ en K^+ ionen via de celmembran van *Escherichia coli* door ouabaine geremd wordt. Voor de handhaving van het intracellulaire natrium- en kaliumgehalte is energie nodig, welke in afwezigheid van glucose blijkbaar niet meer voldoende aanwezig is. Het is dan ook begrijpelijk, dat in afwezigheid van glucose het natriumgehalte stijgt, terwijl het kaliumgehalte daalt. NaCN en NaF gaven wel een significante verhoging van het natriumgehalte, terwijl het kaliumgehalte constant bleef. Blijkbaar is het niet noodzakelijk, dat metabolische remmers tegelijkertijd een effect op het natrium- en kaliumgehalte uitoefenen, zoals Schultz en Solomon (1961) ook reeds voor *Escherichia coli* geconstateerd hebben. Dit betekent wellicht, dat deze verbindingen de leksnelheid van Na^+ ionen vergroten in plaats van de kationenpomp te remmen.

Voor de absolute waarde van het natrium- resp. kaliumgehalte werd gevonden $0,114 \pm 0,010$ en $0,165 \pm 0,015$ eq/kg droog gewicht. Tijdens de logaritmische fase van de groeicurve is het intracellulaire kaliumgehalte hoger dan het natriumgehalte (Schultz en Solomon, 1961). Omdat wij de bacteriën opnieuw in een vers groeimedium geënt hebben, hebben wij dus met een jonge bacteriecultuur gewerkt en het is dan ook begrijpelijk, dat het kaliumgehalte hoger is dan het natriumgehalte. Voor het intracellulaire kaliumgehalte in 32 verschillende gram-positieve of gram-negatieve niet-halofiele bacteriën, die in een bepaald groeimedium gekweekt waren, werd 0,20 tot 1,00 eq/kg droog gewicht gevonden. Eenzelfde waarde werd gevonden voor het intracellulaire natriumgehalte (Christian en Waltho, 1961). De door ons verkregen waarden zijn betrekkelijk laag, hetgeen begrijpelijk is, omdat door het uitwassen met ge-distilleerd water het intracellulaire kaliumgehalte daalt.

VI.4 Invloed van ouabaine op de groeisnelheid van de bacteriën

K^+ ionen zijn essentieel voor de groei (Lester, 1958) en de eiwitsynthese van bacteriën (Lubin, 1964). Omdat dit proces een belangrijke rol speelt bij celdeling en vermenigvuldiging, is het begrijpelijk, dat de groeisnelheid van de bacteriën zal verminderen, wanneer K^+ ionen in het groeimedium een beperkende factor zullen vormen. Het is mogelijk bacteriën te kweken in een groeimedium, dat weinig K^+ ionen bevat; wanneer dan aan dit medium ouabaine toegevoegd wordt, zullen de bacteriën niet meer in staat zijn voldoende K^+ ionen op te nemen, waardoor dus een remming van de groeisnelheid zal optreden.

Om na te gaan of deze gedachtengang juist was hebben wij de invloed van ouabaine op de groeisnelheid van de bacteriën bekeken. Voor deze experimenten was de normale K^+ concentratie (5 mM) in het groeimedium te hoog om



FIGUUR 17 Invloed van ouabaine op de groeisnelheid van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het groeimeidium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; pH 7,0. Concentratie ouabaine: 10^{-4} M.

De toename van het aantal cellen werd ieder uur bepaald door meten van de extinctie bij 400 mμ.

een effect van ouabaine te kunnen waarnemen. Om namelijk de invloed van ouabaine op de groeisnelheid te kunnen nagaan moest de concentratie van K^+ ionen de beperkende factor in het groeimeidium zijn, zodat ouabaine door de antagonistische werking op kalium de intracellulaire concentratie hiervan nog verder zou verlagen. Een verlaging van de concentratie K^+ ionen in het meidium tot ongeveer $10 \mu\text{M}$ maakte het mogelijk de invloed van ouabaine op de groeisnelheid van *Escherichia coli* na te gaan.

Uit figuur 17 blijkt, dat de bacteriecellen langzaam groeiden in een meidium, waarin de K^+ ionen concentratie ongeveer $10 \mu\text{M}$ bedroeg. Wanneer ouabaine aan dit groeimeidium toegevoegd werd, nam de groeisnelheid vooral in de logaritmische groeifase duidelijk af. Ouabaine, dat de kaliumopname van de cellen vermindert, remt daardoor ook de groeisnelheid van de bacteriën.

VI.5 Discussie

De voornaamste doelstelling van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten was na te gaan of ouabaine, dat het $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ systeem in *Escherichia*

coli remt, ook in staat was de intracellulaire kationengehaltes in dit micro-organisme te veranderen. Ouabaine geeft inderdaad een verlaging van het kaliumgehalte en een verhoging van het natriumgehalte, zoals in vele weefsels met een (Na^+-K^+) -ATPase systeem aangetoond is. Dit duidt erop, dat ouabaine het actief natrium- en kaliumtransport in *Escherichia coli* remt. De remming van de groeisnelheid van de bacteriën in aanwezigheid van ouabaine bij een zeer lage concentratie K^+ ionen past eveneens geheel in het beeld van een remming van de kaliumopname door de bacteriecellen.

Naast de bepaling van de invloed van ouabaine op het natrium- en kaliumgehalte in *Escherichia coli* kan ook nog de invloed van deze stof op de kaliumopname door de bacteriecellen *in vitro* bepaald worden. Dit influxproces zou dan eveneens door ouabaine geremd moeten worden. De resultaten van deze experimenten zullen in hoofdstuk VII besproken worden.

OPNAME VAN $^{86}\text{Rb}^+$ DOOR INTACTE CELLEN

VII.1 Inleiding

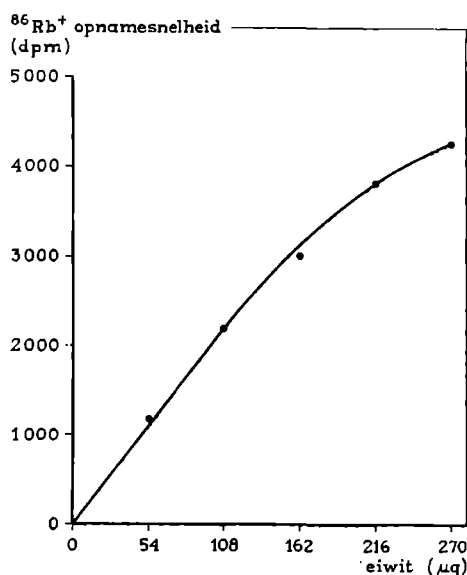
Na het aantonen van het $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ systeem in *Escherichia coli* (hoofdstuk V) en het bepalen van de ouabaine-afhankelijkheid van het transport van Na^+ en K^+ ionen (hoofdstuk VI) bleef nog een derde mogelijkheid open het transport van deze beide kationen te bestuderen. Zoals reeds in I.3 uiteengezet is nemen de cellen K^+ ionen op tegen een concentratiegradient in. Dit z.g. influxproces is *in vitro* te volgen door de opname van K^+ ionen in de cellen gedurende een korte tijd na te gaan. Er moet echter een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen influx en nettotransport. Gaat het bij het netto-transport om veranderingen in het kationengehalte van cellen over een vrij lange tijdsduur, bij het influxproces wordt de werkelijke opname gedurende een korte tijd gevolgd. Gedurende deze tijd dient de opname lineair met de tijd te verlopen. Voor het geval $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ een rol speelt bij deze K^+ influx, zou een remming daarvan door ouabaine verwacht moeten worden.

In het algemeen vindt in dierlijke weefsels bij deze K^+ opname een afgifte van Na^+ ionen plaats. In micro-organismen verloopt dit influxproces van K^+ ionen gecompliceerder. De opname van K^+ ionen gaat vergezeld van de afgifte van Na^+ ionen en van H^+ ionen. Deze K^+-Na^+ uitwisseling en K^+-H^+ uitwisseling zijn uitvoerig bestudeerd in *Escherichia coli* door Schultz en medewerkers (1963), in *Streptococcus faecalis* door Zarlengo en Schultz (1966) en in *Neurospora crassa* door Slayman en Slayman (1968). In *Escherichia coli* vindt primair een K^+-H^+ uitwisseling plaats naast een K^+-Na^+ uitwisseling. Bij het eerste proces wordt ongeveer 60% van het totale kalium opgenomen en uitgewisseld tegen H^+ ionen (Schultz c.s., 1963). Bij *Streptococcus faecalis* echter blijkt 60% van de totale kaliumopname toegeschreven te moeten worden aan een K^+-Na^+ uitwisseling (Zarlengo en Schultz, 1966), terwijl in *Neurospora crassa* 80% gevormd wordt door een K^+-Na^+ uitwisseling (Slayman en Slayman, 1968). Om tussen beide processen te kunnen differentiëren moet de K^+-H^+ uitwisseling zoveel mogelijk vertraagd worden, waardoor de K^+-Na^+ uitwisseling kan prevaleren.

Met behulp van een radioactief isotoop kunnen deze influxprocessen bestudeerd worden. Van praktisch oogpunt uit is $^{42}\text{K}^+$ vrijwel niet bruikbaar, omdat

de halfwaardetijd slechts 12,5 uur is. In vele biologische systemen zijn Rb^+ ionen een goed substituuut voor K^+ ionen, zoals blijkt uit het feit, dat Rb^+ ionen in staat zijn K^+ ionen te vervangen bij de groei van bacteriën (Lester, 1958) of bij de activering van sommige enzymen (Black, 1951; Cohn en Monod, 1951). Rb^+ ionen remmen de opname van K^+ ionen in gist (Conway en Duggan, 1958), hetgeen ook wijst op een verwantschap in chemische eigenschappen. In het (Na^+-K^+) -ATPase systeem kunnen K^+ ionen vervangen worden door Rb^+ ionen (Skou, 1960), zoals ook wij voor het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in *Escherichia coli* aangetoond hebben (III.9.1). De gelijkwaardigheid van K^+ en Rb^+ ionen blijkt echter niet in alle gevallen te bestaan. Hoewel Bonting en Caravaggio (1966) in *Ulva lactuca* het influxproces met Rb^+ ionen gemeten hebben, vonden West en Pitman (1967) een verschillende opnamesnelheid van Rb^+ en K^+ ionen in deze alg. Niettemin hebben wij gemeend voor de bestudering van het influxproces in *Escherichia coli* gebruik te mogen maken van $^{86}\text{Rb}^+$ (halfwaardetijd 19,5 dag), omdat het vrijwel dezelfde activerende werking als K^+ heeft op het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in dit organisme.

Wij hebben de $^{86}\text{Rb}^+$ opname gemeten in een incubatiemedium, dat dezelfde



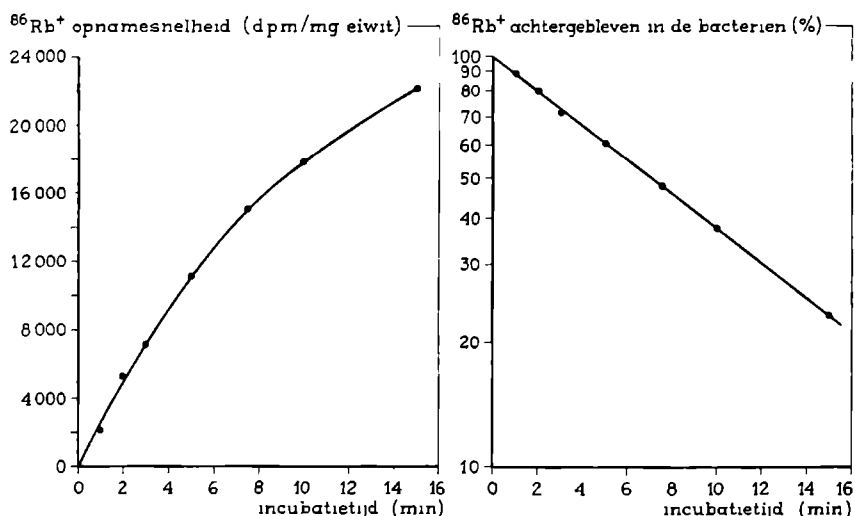
FIGUUR 18 Snelheid van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli* als functie van het aantal cellen.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC; pH 7,0. Eiwit: 54 tot 270 μg . Incubatietijd: 5 minuten.

samenstelling had als het groeimedium van de bacteriën, waarbij KCl en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ weggelaten werden; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ om de bacteriën een stikstofbron te onthouden en KCl, omdat K^+ ionen een remmend effect hebben op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname. Alle experimenten werden uitgevoerd met bacteriën, welke na een groei van 24 uur geogst werden.

VII.2 Opnamesnelheid van $^{86}\text{Rb}^+$ in afhankelijkheid van het aantal cellen en de incubatietijd*

De opnamesnelheid van $^{86}\text{Rb}^+$ in afhankelijkheid van de hoeveelheid bacteriën is in figuur 18 weergegeven. Van 54 tot 162 μg eiwit was deze opname praktisch lineair; voor hogere concentraties eiwit gold dit echter niet meer. De afhankelijkheid van de opnamesnelheid met de incubatietijd is in figuur 19



FIGUUR 19 (links) Snelheid van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli* als functie van de incubatietijd.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC; pH 7,0. Eiwit: 160 μg .

FIGUUR 20 (rechts) Bepaling van de halfwaardetijd voor de uitwisseling van $^{86}\text{Rb}^+$ in *Escherichia coli*. De gegevens van figuur 19 werden na omrekening semi-logaritmisch uitgezet tegen de tijd.

* De in dit hoofdstuk beschreven experimenten werden uitgevoerd door Mej. E. A. M. A. Duffhues, die ik hiervoor veel dank verschuldigd ben.

weergegeven. Tot een incubatietijd van 5 min werd een praktisch lineair verband gevonden. In de verdere experimenten hebben wij ongeveer 150–170 µg eiwit gebruikt en een incubatietijd van 5 min aangehouden.

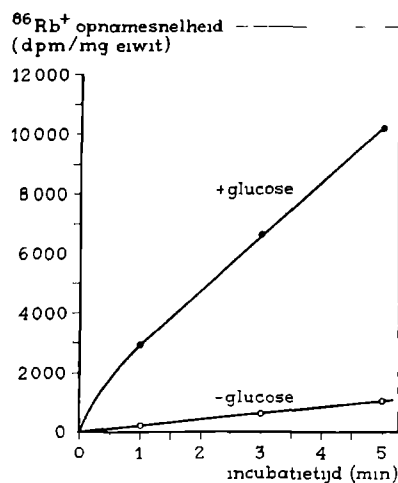
Met behulp van een vergelijking voor een gesloten systeem van twee compartimenten in de „steady state” is het mogelijk de halfwaardetijd voor de uitwisseling van $^{86}\text{Rb}^+$ via het membraan te berekenen. Hierbij moet vooropgesteld worden, dat beide compartimenten volledig mengbaar zijn en dat de uit te wisselen stof ($^{86}\text{Rb}^+$) gelijkmatig over beide compartimenten verdeeld is. Door semi-logaritmisch het percentage $^{86}\text{Rb}^+$, dat in de bacteriën achterblijft, uit te zetten tegen de tijd werd een rechte lijn verkregen (figuur 20). Hieruit werd een halfwaardetijd van 7,0 min berekend. Deze komt goed overeen met de waarde verkregen voor de K^+ opname in *Neurospora crassa*, welke 7,5 min bedraagt (Slayman en Slayman, 1968). Voor de K^+-Na^+ uitwisseling in *Escherichia coli* hebben Schultz en medewerkers (1963) een halfwaardetijd van 11,5 min bepaald.

VII.3 Invloed van glucose op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname

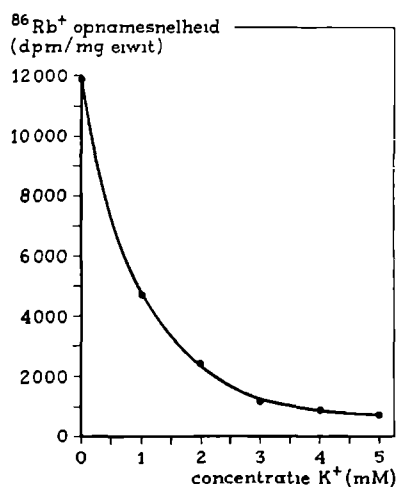
Schultz en Solomon (1961) en Günther en Dorn (1966b) hebben aangetoond, dat de opname van K^+ ionen door kalium-arme cellen van *Escherichia coli* afhankelijk is van de stofwisseling. In afwezigheid van glucose vond een veel geringere kaliumopname plaats. Dit wordt ondersteund door de bevindingen van Zarlengo en Schultz (1966), die eenzelfde resultaat verkregen voor *Streptococcus faecalis*. In dit micro-organisme is het kationentransport afhankelijk van het metabolisme van exogeen substraat, waarbij glucose en arginine dit transport bevorderen. De snelheid van ATP vorming bij beide substraten is even groot als de snelheid van de K^+ opname. Uit figuur 21 blijkt, dat in afwezigheid van glucose de $^{86}\text{Rb}^+$ opname in *Escherichia coli* slechts ongeveer 10% vormt van de opname in aanwezigheid van glucose. Deze opname van 10% wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van substraten in de toegevoegde bacteriesuspensie. Een analoge opname zonder exogeen substraat hebben Slayman en Tatum (1965) aangetoond voor *Neurospora crassa*.

VII.4 Invloed van K^- ionen op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname

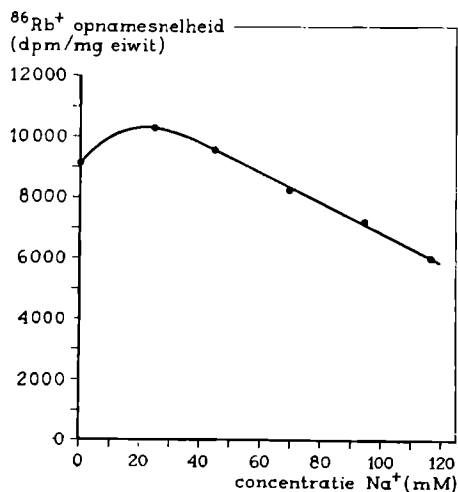
Omdat bij deze experimenten Rb^+ ionen een substituut zijn voor K^+ ionen hebben wij nagegaan wat de invloed is van een toenemende concentratie van K^- ionen op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname. Zoals uit figuur 22 blijkt, werd een maximale opname verkregen in afwezigheid van K^+ ionen. Door verhoging van de concentratie van K^- ionen nam de $^{86}\text{Rb}^+$ opname af totdat deze bij 4–5 mM K^+



FIGUUR 21 Invloed van glucose op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli*. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC; pH 7,0. Eiwit: 160 μg . Eindconcentratie glucose: 60 mM.



FIGUUR 22 Invloed van K^+ ionen op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli*. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC; pH 7,0. Eiwit: 160 μg . Incubatietijd: 5 min. Eindconcentratie KCl: 1 tot 5 mM.



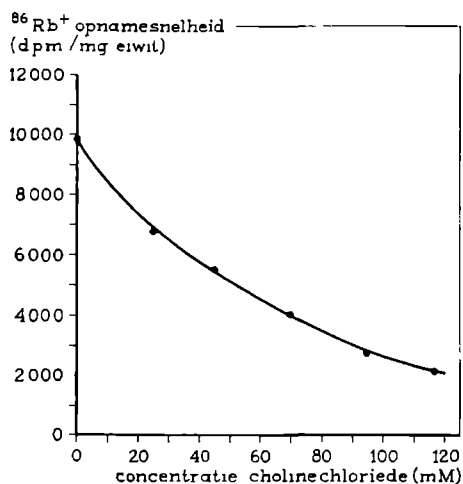
FIGUUR 23 Invloed van Na⁺ ionen op de ⁸⁶Rb⁺ opname door *Escherichia coli*. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: H₃PO₄ 62; citroenzuur 5; MgSO₄ 0,4; glucose 60; ⁸⁶Rb⁺ 0,5 mC. Met Tris werd de pH op 7,0 gebracht. Eiwit: 160 µg. Incubatietijd: 5 min. Eindconcentratie NaCl: 25 tot 117 mM.

in het extracellulaire medium praktisch constant was. Deze remming van de ⁸⁶Rb⁺ opname door K⁺ ionen wijst op een gelijk transportmechanisme van beide kationen. Ter verkrijging van een maximale ⁸⁶Rb⁺ opname werden daarom K⁺ ionen uit het incubatiemedium weggelaten.

VII.5 Invloed van Na⁺ ionen en cholinechloride op de ⁸⁶Rb⁺ opname

Om na te gaan of de invloed van K⁺ ionen op de ⁸⁶Rb⁺ opname specifiek is, hebben wij het effect van Na⁺ ionen in het incubatiemedium op het opnameproces onderzocht. Uit figuur 23 blijkt, dat Na⁺ ionen een geheel andere invloed dan K⁺ ionen hadden. Tot een concentratie van 25 mM Na⁺ vond een geringe verhoging van de ⁸⁶Rb⁺ opname plaats, terwijl hogere concentraties van Na⁺ ionen een remming gaven, die mogelijk veroorzaakt kon worden door de hoge ionensterkte van het incubatiemedium. Dit laatste kon bevestigd worden door de ⁸⁶Rb⁺ opname te bepalen in aanwezigheid van cholinechloride (figuur 24). Hierbij werd een geleidelijke vermindering van de ⁸⁶Rb⁺ opname waargenomen tot een concentratie van 117 mM cholinechloride.

Uit een vergelijking van beide curven (figuur 23 en 24) komt duidelijk naar voren, dat cholinechloride de ⁸⁶Rb⁺ opname in alle concentraties remde, terwijl Na⁺ ionen alleen bij hogere concentraties een remming veroorzaakten.



FIGUUR 24 Invloed van cholinechloride op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli*. Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: H_3PO_4 62; citroenzuur 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC. Met Tris werd de pH op 7,0 gebracht. Eiwit: 160 μg . Incubatietijd: 5 min. Eindconcentratie cholinechloride: 25 tot 117 mM.

Deze remmende invloed van Na^+ ionen was veel geringer dan van cholinechloride in dezelfde concentraties, zodat geconcludeerd mag worden dat Na^+ ionen in eerste instantie een stimulerende werking op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname hadden, welke bij hogere concentraties door een niet-specifiek effect van de ionensterkte tegen- gewerkt werd.

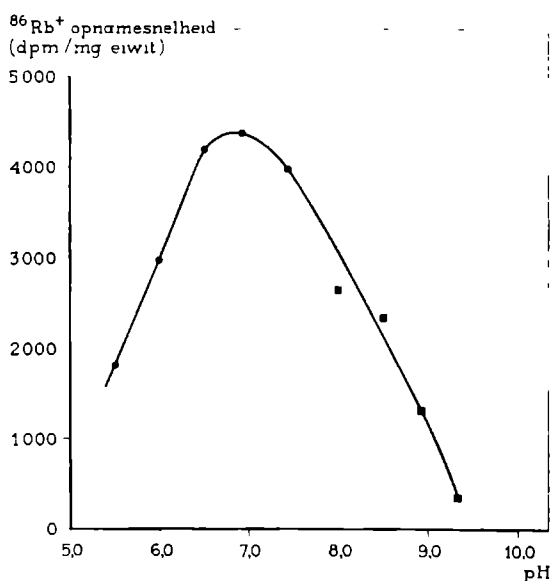
VII.6 Invloed van de pH op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname

Solomon (1962) heeft aangetoond, dat voor opname van K^+ ionen anorganisch fosfaat in het extracellulaire medium aanwezig moet zijn. In afwezigheid hiervan vindt praktisch geen kaliumopname plaats. Bij de bepaling van het pH optimum van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname hebben wij dan ook gebruik gemaakt van Tris-histidine buffers om een wisselende invloed van verschillende hoeveelheden anorganisch fosfaat in de buffermengsels te voorkomen. Zoals uit figuur 25 blijkt, was de $^{86}\text{Rb}^+$ opname optimaal bij pH 7,0, terwijl zowel bij lagere als hogere pH een regelmatige afname van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname plaats vond. Deze waarnemingen komen niet overeen met die van Armstrong en Rothstein (1964) voor bakkersgist. Zij hebben aangetoond, dat in aanwezigheid van 5 mM K^+ in het extracellulaire medium tussen pH 3,0 en 4,5 een verhoging van de K^+ opname plaats vond, maar dat deze tussen pH 6 en 8 constant was.

Tot pH 4,0 remmen H^+ ionen competitief de K^+ opname, terwijl tussen pH 4,0 tot 6,0 H^+ ionen als een non-competitieve remmer werken. Zij concluderen hieruit, dat er op het carrier-molecuul 2 plaatsen zijn, waarmee de H^+ ionen kunnen reageren. Onze resultaten komen meer overeen met die van Epstein en Schultz (1966), die geconstateerd hebben, dat er in *Escherichia coli* een duidelijke afname plaats vond van de $^{42}K^+$ influx tussen pH 7,5 en 5,7. Hoewel Solomon (1962) constateerde, dat voor K^- opname anorganisch fosfaat noodzakelijk is, hebben wij een duidelijke opname van $^{86}Rb^+$ gevonden in afwezigheid hiervan. Wel echter werd bij pH 7,0 in aanwezigheid van 62 mM anorganisch fosfaat een driemaal zo grote opname van $^{86}Rb^+$ gevonden als in afwezigheid van fosfaat.

VII.7 Invloed van ouabaine en andere remstoffen op de $^{86}Rb^+$ opname

Toen de voornaamste eigenschappen van deze opname van $^{86}Rb^+$ ionen bekend waren, werd de invloed van ouabaine hierop nagegaan. Om het effect van dit hartglycoside beter te kunnen bepalen werden daarnaast ook enige me-



FIGUUR 25 Invloed van de pH op de $^{86}Rb^+$ opname door *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: pH 5,5-7,4 ●—● Tris-histidine-HCl beide 50; pH 8,0-9,3 ■—■ Tris-HCl 100; $MgSO_4$ 0,4; citroenzuur 5; glucose 60; NaCl 117; $^{86}Rb^+$ 0,5 mC. Eiwit: 160 μg . Incubatietijd: 5 min.

TABEL XVII Invloed van verschillende remmers op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC; pH 7,0. Eiwit $\sim 160 \mu\text{g}$. Incubatietijd: 5 min.

$^{86}\text{Rb}^+$ opname uitgedrukt als percentage van de controlewaarde met standaardfout en tussen haakjes het aantal bepalingen.

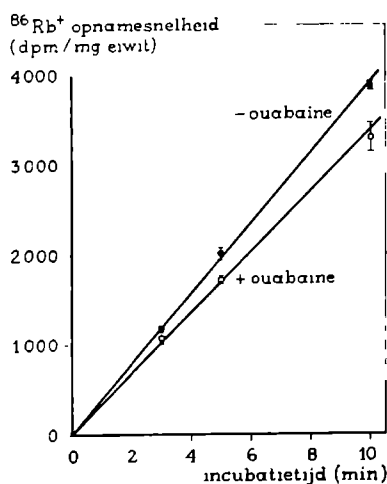
Remmer ($8 \times 10^{-5}\text{M}$)	$^{86}\text{Rb}^+$ opname (%)
1 -	100 (6)
2 ouabaine	$98,6 \pm 1,1$ (6)
3 DNP	$80,1 \pm 2,9$ (5)
4 NaCN	$93,5 \pm 3,1$ (4)
5 NaF	$94,0 \pm 3,4$ (4)
Verschil 1-2	P = 0,26
1-3	P = 0,0032
1-4	P = 0,128
1-5	P = 0,176

tabolische remmers aan het incubatiemedium toegevoegd. Zoals uit tabel XVII blijkt, had ouabaine ($8 \times 10^{-5} \text{M}$) geen invloed op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname bij pH 7,0, hetgeen niet in overeenstemming is met het feit, dat bij deze pH ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase activiteit in *Escherichia coli* aangetoond is. NaF en NaCN hadden evenmin enige invloed op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname, terwijl DNP 20% remming veroorzaakte. Dit sluit goed aan bij de resultaten van Epstein en Schultz (1966), die in *Escherichia coli* door DNP, tot een maximale concentratie van $3 \times 10^{-4} \text{M}$, wel een remming van de $^{42}\text{K}^+$ influx vonden, maar geen invloed op de netto-flux. Ook dit laatste konden wij bevestigen, aangezien DNP geen invloed had op veranderingen in het natrium- en kaliumgehalte (hoofdstuk VI). Ook in *Neurospora crassa* werd aangetoond, dat DNP de opname van K^+ ionen remt (Slayman en Tatum, 1965).

VII.8 Invloed van ouabaine op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname bij pH 5,3

Het voornaamste doel van deze experimenten was na te gaan of ouabaine invloed had op de $^{86}\text{Rb}^+$ influx, hetgeen eveneens een ondersteuning zou zijn voor de aanwezigheid van een door ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase veroorzaakt kationen-transport in *Escherichia coli*. Zoals uit tabel XVII blijkt, had ouabaine geen invloed, wanneer de $^{86}\text{Rb}^+$ opname gemeten werd bij pH 7,0. Nu is in I.6.1 reeds uiteengezet, dat zowel een $\text{K}^+ - \text{H}^+$ uitwisseling als een $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ uitwisse-

ling in *Escherichia coli* optreden. Een mogelijkheid tot differentiatie tussen deze beide uitwisselingsmechanismen is gelegen in een verlaging van de pH tot 5,15–5,50, waardoor de K^+-H^+ uitwisseling sterk verminderd wordt (Schultz c.s., 1963). Daarom hebben wij de $^{86}Rb^+$ influx gemeten bij pH 5,3. Volgens Schultz en medewerkers (1963) is deze K^+-Na^+ uitwisseling afhankelijk van de aanwezigheid van K^+ ionen in het incubatiemedium. Wij hebben echter geen K^+ ionen aan het incubatiemedium toegevoegd, omdat deze de $^{86}Rb^+$ opname verminderden bij pH 5,3 en een antagonistische werking hebben op ouabaine. Figuur 26 geeft een representatief experiment weer van de opname van $^{86}Rb^+$ in *Escherichia coli* bij pH 5,3. Tot aan de gemeten tijd (10 minuten) werd een volkomen lineair verband gevonden. Toevoegen van ouabaine (8×10^{-3} M) gaf over het gehele gebied een vermindering van de opname van $^{86}Rb^+$. Uit tabel XVIII blijkt, dat wanneer de $^{86}Rb^+$ opname bij 3, 5 of 10 minuten in afwezigheid van ouabaine op 100% gesteld wordt, een vermindering van de opname plaats vond tot respectievelijk 92,8, 90,6 en 90,5%. Omdat de $^{86}Rb^+$ opname lineair toenam met de tijd, kan geconcludeerd worden dat de hier gemeten influx althans gedeeltelijk door ouabaine geremd kon worden. Slayman en Slayman (1968) vonden geen invloed van ouabaine op de kationenfluxes in *Neurospora crassa*.



FIGUUR 26 Invloed van ouabaine op de $^{86}Rb^+$ opname bij pH 5,3 door *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; $MgSO_4$ 0,4; glucose 60; $^{86}Rb^+$ 0,5 mC. De pH werd met H_3PO_4 op 5,3 gebracht. Eiwit: 160 μ g. Eindconcentratie ouabaine: 8×10^{-3} M.

TABEL XVIII Invloed van ouabaine op de $^{86}\text{Rb}^+$ opname bij pH 5,3 door *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

NaH_2PO_4 22; Na_2HPO_4 40; natriumcitraat 5; MgSO_4 0,4; glucose 60; $^{86}\text{Rb}^+$ 0,5 mC. Met H_3PO_4 werd de pH op 5,3 gebracht. Eiwit: $\approx 160\mu\text{g}$.

$^{86}\text{Rb}^+$ opname uitgedrukt als percentage van de controlewaarde bij ieder tijdstip met standaardfout. Gemiddelden van 6 experimenten.

Tijd	3 min	5 min	10 min
— ouabaine	100	100	100
+ ouabaine ($8 \times 10^{-3}\text{M}$)	$92,8 \pm 1,9$	$90,6 \pm 2,3$	$90,5 \pm 1,7$
verschil	$P = 0,013$	$P = 0,0095$	$P = 0,0028$

VII.9 Efflux van $^{22}\text{Na}^+$

Het is begrijpelijk, dat wij na het meten van de opname van $^{86}\text{Rb}^+$ door de bacteriecellen geprobeerd hebben de efflux van $^{22}\text{Na}^+$ te bestuderen en vooral of dit proces door ouabaine geremd kon worden. Hiervoor moesten bacteriën gekweekt en geoogst worden, welke $^{22}\text{Na}^+$ bevatten. Ondanks het aanbrengen van een aantal variabelen, zoals verandering in de Na^+ concentratie, pH, temperatuur en incubatietijd is het ons niet gelukt bacteriën te kweken, welke $^{22}\text{Na}^+$ bevatten. Het was dan ook niet mogelijk het effluxproces en de eventuele invloed van ouabaine daarop te bestuderen.

VII.10 Discussie

Voor de bestudering van het kaliumtransport in micro-organismen is vaak gebruik gemaakt van radio-isotopen. Als voorbeeld hiervan kunnen genoemd worden *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* en *Neurospora crassa*. Hierbij is voor deze organismen gevonden, dat de opname van K^+ ionen de aanwezigheid van een substraat vereist en dat er een competitie tussen K^+ en Rb^+ ionen bestaat.

Bij onze experimenten hebben wij dezelfde resultaten verkregen. Dat de opname van $^{86}\text{Rb}^+$ ionen afhankelijk is van de aanwezigheid van een substraat, dat door *Escherichia coli* gemetaboliseerd kan worden, is duidelijk geworden uit het feit, dat in afwezigheid van glucose de opname van $^{86}\text{Rb}^+$ slechts 10% bedraagt van die in aanwezigheid van glucose. De remming van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname door DNP ondersteunt deze redenering. Ook K^+ ionen remmen de $^{86}\text{Rb}^+$ opname, hetgeen eveneens overeenkomt met de resultaten verkregen met andere micro-organismen.

Bij dit soort experimenten is het van groot belang, dat de $^{86}\text{Rb}^+$ opname

lineair verloopt met de tijd. Wanneer dan door toevoegen van ouabaine over de gehele incubatieperiode een remming plaats vindt van de opname, kan dit als een bewijs voor een rol van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in de actieve opname van $^{86}\text{Rb}^+$ ionen beschouwd worden. Bakkeren en Bonting (1968b) hebben de $^{86}\text{Rb}^+$ opname in coupes van rattelever bepaald. Tot 30 minuten werd een lineaire opname van $^{86}\text{Rb}^+$ ionen gevonden als functie van de tijd; bij langere incubatietijd nam deze opnamesnelheid af. Er is dan sprake van een uitwisselingsproces. Door toevoegen van ouabaine werd een remming van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname gevonden. Ditzelfde principe hebben wij toegepast voor de bepaling van de actieve opname van $^{86}\text{Rb}^+$ ionen in *Escherichia coli*. Uit I.5 is reeds duidelijk geworden, dat het (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het actief kationentransport een groot aantal overeenkomstige eigenschappen bezitten. Aangezien voor het (Na^+-K^+) -ATPase systeem een pH optimum bij 7,7 gevonden is, hebben wij in eerste benadering deze $^{86}\text{Rb}^+$ opname gemeten bij ongeveer dezelfde pH. Het pH optimum (7,0) kwam hier redelijk goed mee overeen. Remming door ouabaine werd echter niet gevonden bij deze pH. De $^{86}\text{Rb}^+$ opname bij pH 7,0 zal dan ook beschouwd moeten worden als zijnde grotendeels een K^+-H^+ uitwisseling. Om dit proces zo veel mogelijk te remmen hebben wij daarom de $^{86}\text{Rb}^+$ opname gemeten bij pH 5,3. Hierbij werd tot een incubatietijd van 10 minuten een lineaire toename van deze opname gevonden, welke door toevoegen van ouabaine gedeeltelijk geremd kon worden. Naast de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit en de verschuiving in het gehalte van de beide kationen door ouabaine mag deze remming van de $^{86}\text{Rb}^+$ opname beschouwd worden als een verder bewijs, dat dit (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het daarmee verbonden actief kationentransport in *Escherichia coli* K-12 aanwezig zijn.

ZURE PHOSPHATASE: EIGENSCHAPPEN EN RELATIE TOT HET (Na⁺-K⁺)-ATPASE SYSTEEM

VIII.1 Inleiding

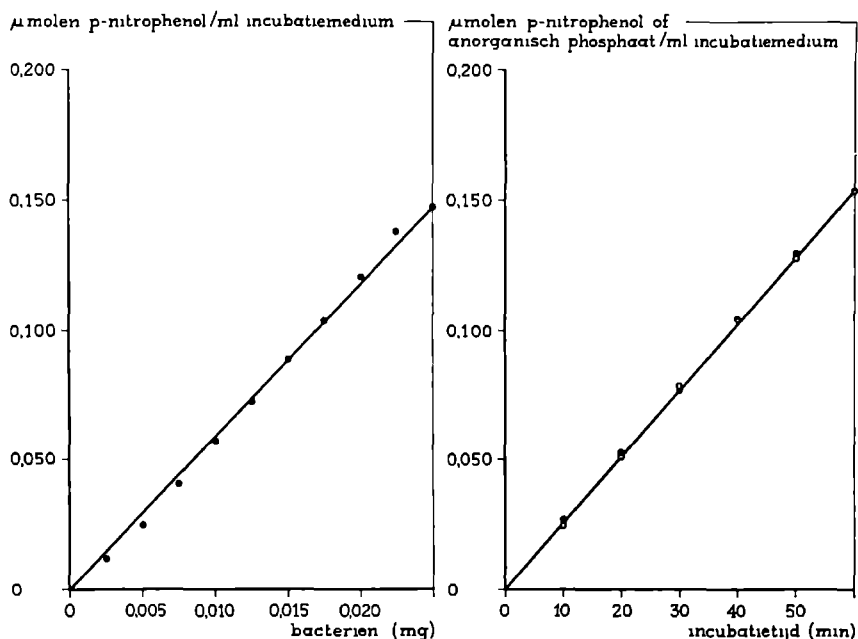
In I.4.4 is reeds uitvoerig beschreven, dat volgens huidige literatuurgegevens een K⁺-afhankelijke phosphatase activiteit nauw verbonden is met het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem. In die weefsels, waarin een (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit aangetoond is, komt bij neutrale pH een phosphatase activiteit voor, welke door K⁺ ionen gestimuleerd kan worden (Ahmed en Judah, 1964; Nagai c.s., 1966; Bader en Sen, 1966; Fujita c.s., 1966; Sachs c.s., 1967). Deze phosphatase heeft andere eigenschappen dan de alkalische phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) (pH optimum ~ 10) en de zure phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.2) (pH optimum 4-5). De K⁺-gestimuleerde phosphatase activiteit, die bepaald kan worden met p-nitrophenylphosphaat als substraat wordt zowel door ouabaine als door Na⁺ ionen geremd.

Na het aantonen van (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit in *Escherichia coli* (hoofdstuk V) lag het voor de hand na te gaan of de K⁺-gestimuleerde phosphatase ook in dit micro-organisme aanwezig is. Bij pH 7,5 was echter geen phosphatase activiteit aantoonbaar. Wel was in *Escherichia coli* een zure phosphatase aanwezig met optimale activiteit bij pH 2,5.

In dit hoofdstuk zullen een aantal eigenschappen van dit enzym beschreven worden, waarbij vooral de nadruk gelegd wordt op het verschil in eigenschappen met de K⁺-gestimuleerde phosphatase in zoogdierweefsels. Eveneens zal de relatie van dit enzym tot het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem in *Escherichia coli* besproken worden.

VIII.2 Reactiesnelheid van de zure phosphatase als functie van de enzymconcentratie en de incubatietijd

In figuur 27 is de snelheid van hydrolyse van p-nitrophenylphosphaat uitgezet als functie van de enzymconcentratie. In het gemeten gebied van 0,0025 tot 0,025 mg bacteriën per ml incubatiemedium was de reactiesnelheid recht evenredig met de enzymconcentratie.



FIGUUR 27 (links) Snelheid van de hydrolyse van p-nitrophenylfosfaat als functie van de hoeveelheid toegevoegde bacteriën.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: glycine-HCl (pH 2,5) 85; p-nitrophenylfosfaat 7,5. Bacteriën: 0,0025 tot 0,025 mg.

FIGUUR 28 (rechts) Snelheid van de hydrolyse van p-nitrophenylfosfaat als functie van de incubatietijd.

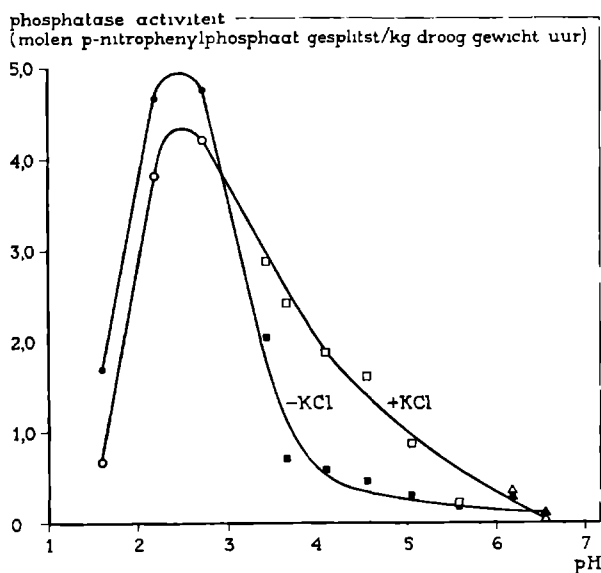
Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: glycine-HCl (pH 2,5) 85; p-nitrophenylfosfaat 7,5. Bacteriën: 0,025 mg.

● — p-nitrophenol; ○ — anorganisch fosfaat.

De snelheid van hydrolyse van p-nitrophenylfosfaat als functie van de incubatietijd is in figuur 28 weergegeven. In de totaal gemeten tijd (60 minuten) werd een lineair verband gevonden tussen de hydrolyse van het substraat en de incubatietijd. Equimolaire hoeveelheden p-nitrophenol en Pi werden gevormd uit het substraat p-nitrophenylfosfaat.

VIII.3 pH Optimum

In figuur 29 is de fosfatase activiteit uitgezet als functie van de pH van het incubatiemedium. In afwezigheid van KCl lag het pH optimum bij pH 2,5, terwijl boven pH 4,0 praktisch geen enzymatische activiteit meer gevonden



FIGUUR 29 pH-activiteitscurve van de phosphatase activiteit van *Escherichia coli* in afwezigheid en aanwezigheid van KCl.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: pH 1,6–2,7 ○—○ en ●—● glycine-HCl 85; pH 3,4–5,6 □—□ en ■—■ barnsteenzuur-Tris 85; pH 6,2 en 6,6 △—△ en ▲—▲ histidine-HCl 85; p-nitrophenylphosfaat 7,5. Bacteriën: 0,025 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM.

werd. Er zijn slechts weinig enzymen met een dergelijk laag pH optimum bekend. Een voorbeeld hiervan is pepsine (EC 3.4.4.1). Een phosphatase met een pH optimum bij 2,6–2,8 is door Rogers en Reithel (1960) aangetoond in *Escherichia coli* ML 308. Door zuivering van een cel-vrij extract via $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitatie, chromatographie over DEAE-cellulose en hydroxylapatiet en zone-electrophorese met zetmeel als drager verkregen zij vijf typen van phosphatase activiteit, die verschillen in pH optimum, K_m waarde, turnover number en stabiliteit vertoonden. Eén van deze phosphatasen, door Rogers en Reithel (1960) phosphatase IIc-1 genoemd, komt in een aantal eigenschappen overeen met de hier beschreven phosphatase. Er was echter een opvallend verschil. Konden wij deze enzymatische activiteit aantonen in intacte cellen van *Escherichia coli*, Rogers en Reithel (1960) verkregen pas na een aantal zuiveringsstappen deze phosphatase met dit lage pH optimum. Evenals de genoemde auteurs verkregen wij hetzelfde pH optimum met fructose 1,6-diphosfaat als substraat. Andere zure phosphatasen uit *Escherichia coli* hebben een hoger pH optimum: 4,7 (*Escherichia coli* ML 308) (von Hofsten en Porath, 1962), 5,0 en 5,5–6,0 (*Escherichia coli* K 37) (Dvorak c.s., 1967) en 4,3–6,0 (*Escherichia coli* ML 308)

(Rogers en Reithel, 1960). Wanneer wij de zure phosphatase activiteit bepaalden in *Escherichia coli* K-12 gekweekt in de media beschreven door von Hofsten en Porath (1962), Dvorak en medewerkers (1967) en Rogers en Reithel (1960), dan konden wij een aantal phosphatasen aantonen met verschillende pH optima, maar met het in II.1 beschreven groeimedum konden wij in *Escherichia coli* K-12 uitsluitend een zure phosphatase aantonen met een pH optimum bij 2,5.

Wanneer aan het incubatiemedium KCl (eindconcentratie: 140 mM) toegevoegd werd, veranderde het gehele beeld van de pH-activiteitscurve. Tot aan pH 2,9 had KCl een remmend effect op de phosphatase activiteit. Ook in aanwezigheid van KCl lag het pH optimum bij 2,5, waarbij een vermindering van 12% in activiteit geconstateerd werd. Toevoeging van KCl had wel een stimulerende invloed op de phosphatase activiteit tussen pH 3,0 en 6,5. Het verschil tussen de activiteiten in afwezigheid en in aanwezigheid van KCl werd verkregen door de enzymatische activiteiten bij de verschillende pH waarden van elkaar af te trekken. De grootste activering door KCl werd verkregen bij pH 3,6.

Analoog aan de K⁺-gestimuleerde phosphatase in zoogdierweefsels wordt de activering van de phosphatase activiteit in *Escherichia coli* mogelijk veroorzaakt door de K⁺ ionen. Daarom werd het effect van verschillende monovalente kationen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6 nagegaan.

VIII.4 Invloed van monovalente kationen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6

Tabel XIX toont het effect van verschillende monovalente kationen (toege-

TABEL XIX Invloed van monovalente kationen op de zure phosphatase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 3,6.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; p-nitrophenylphosphaat 7,5. Bacteriën: 0,025 mg.

De kationen werden toegevoegd als chloriden, eindconcentratie: 140 mM.

Activiteit uitgedrukt in molen p-nitrophenylphosphaat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Kation	Activiteit
-	0,63
Li ⁺	2,60
Na ⁺	2,70
K ⁺	2,67
Rb ⁺	2,43
Cs ⁺	2,70
NH ₄ ⁺	2,54
choline	2,40

TABEL XX Invloed van verschillende anionen op de zure phosphatase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 3,6.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; p-nitrophenylphosphaat 7,5. Bacteriën: 0,025 mg. De anionen werden toegevoegd als natrium- of kaliumzouten. Eindconcentratie: 140 mM. Activiteit uitgedrukt in molen p-nitrophenylphosphaat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Anion	Activiteit	
	natriumzout	kaliumzout
-	0,63	0,63
Cl ⁻	2,76	2,70
Br ⁻	3,15	3,66
I ⁻	4,59	5,25
NO ₃ ⁻	4,05	3,90
SO ₄ ²⁻	0,19	0,18

voegd als chloriden; eindconcentratie: 140 mM) op de phosphatase activiteit bij pH 3,6. Alle ionen inclusief cholinechloride gaven een gelijke verhoging van de enzymatische activiteit. Dit betekent dus, dat de activerende werking van deze zouten veroorzaakt wordt door het anion en niet door het kation. Het lag dan ook voor de hand de invloed van verschillende anionen op de activiteit van de zure phosphatase bij pH 3,6 na te gaan.

VIII.5 Invloed van verschillende anionen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6

Uit tabel XX, waarin de invloed van verschillende kalium- en natriumzouten aangegeven staat, blijkt dat het kation niet de mate van stimulering bepaalde. De anionen verhoogden de phosphatase activiteit bij pH 3,6 echter in zeer verschillende mate. Iodide gaf de grootste verhoging, terwijl sulfaat de phosphatase activiteit voor ongeveer 70 % remde.

Een uitvoerig onderzoek naar de invloed van verschillende ionen op de zure phosphatase activiteit van *Tetrahymena pyriformis* is door Lazarus en Scherbaum (1967) uitgevoerd. Een toename van de activiteit (13 %) werd veroorzaakt door 5 mM EDTA; een hogere concentratie hiervan (20 mM) had geen invloed. Een volledige remming werd bereikt met 50 mM NaF. Ook wij verkregen hiermede een volledige remming van de phosphatase activiteit van *Escherichia coli* bij pH 2,5; maar 5 mM EDTA gaf een remming van 34 %. Kuo en Blumenthal (1961b) hebben een zure phosphatase gezuiverd uit mycelium van *Neurospora crassa*. EDTA (50 mM) had geen invloed op deze phosphatase, terwijl NaF (0,75 mM) praktisch volledige remming veroorzaakte. Oxalaat (12,5 mM) remde

de phosphatase activiteit van deze schimmel volledig, wanneer de activiteit gemeten werd met β -glycerolphosfaat als substraat, maar met p-nitrophenylphosfaat was de remming 72 %. Wij vonden voor de zure phosphatase activiteit van *Escherichia coli* eenzelfde percentage remming met 5 mM oxalaat bij pH 2,5.

Een verdere vergelijking met gegevens uit de literatuur is niet mogelijk, omdat wij de invloed van de ionen bij pH 3,6 onderzocht hebben, waar het grootste verschil in enzymatische activiteit gevonden werd in afwezigheid en in aanwezigheid van KCl. Andere onderzoekers hebben de invloed van ionen altijd bij het pH optimum van het enzym nagegaan.

Uit deze invloed van de anionen op de phosphatase activiteit bij pH 3,6 in *Escherichia coli* kunnen wij concluderen, dat in dit micro-organisme een anion-gestimuleerde phosphatase aanwezig is.

VIII.6 Invloed van ouabaine op de toename van de phosphatase activiteit bij pH 3,6

Zoals reeds uiteengezet is (I.4.4), remt ouabaine bij pH 7,5 de K^+ -gestimuleerde phosphatase in zoogdierweefsels. Wij hebben nagegaan welke invloed ouabaine op de toename van de phosphatase activiteit bij pH 3,6 heeft. Deze toename van de phosphatase activiteit, veroorzaakt door KCl (eindconcentratie: 140 mM) werd door 10^{-4} M ouabaine niet geremd; in afwezigheid respectievelijk aanwezigheid van ouabaine werd een enzymatische activiteit gemeten van $1,87 \pm 0,07$ en $1,91 \pm 0,12$, waarbij beide activiteiten uitgedrukt zijn in molen p-nitrophenylphosfaat gesplitst/kg droog gewicht . uur (4 experimenten; $P = 0,78$). Ook bij een lage concentratie van KCl (5 mM) werd geen invloed van ouabaine gevonden. Dit was te verwachten, want uit tabel XX was reeds duidelijk geworden, dat de activiteitsverhoging veroorzaakt werd door de anionen.

Wanneer KCl in toenemende mate vervangen werd door NaCl, waarbij de eindconcentratie van de toegevoegde kationen constant (140 mM) gehouden werd, veranderde de phosphatase activiteit bij pH 3,6 niet. Dit betekent dus, dat Na^+ ionen de door KCl veroorzaakte toename van de phosphatase activiteit niet remden.

VIII.7 Substraatspecificiteit

De substraatspecificiteit van de zure phosphatase werd bepaald bij pH 2,5. Zoals uit tabel XXI blijkt, werden naast p-nitrophenylphosfaat vooral de beide diphosphaten fructose 1,6-diphosfaat en 2,3-diphosphoglycerinezuur goed gehydrolyseerd. Ook acetylphosfaat, dat als substraat voor de K^+ -gesti-

muleerde phosphatase gebruikt werd (Izumi c.s., 1966), was voor deze zure phosphatase een goed substraat. Evenals de overige glycolyse-intermediären werden ATP, ADP en AMP slecht gehydrolyseerd.

In het algemeen vertonen de zure phosphatasen van *Escherichia coli* een zeer verschillende substraatspecificiteit. Glucose 6-phosphaat en AMP waren betere substraten voor de phosphatase IIC-1 (Rogers en Reithel, 1960) dan voor de hier beschreven zure phosphatase. Dvorak en medewerkers (1967) hebben door osmotische „shock” drie phosphatase fracties uit *Escherichia coli* verkregen. Naast een cyclisch phosphodiesterase hebben zij een hexose phosphatase aangetoond, die glycolyse-intermediären hydrolyseerde, en een niet-specifieke, zure phosphatase, waarvoor p-nitrophenylphosphaat het beste substraat was. Von Hofsten en Porath (1962) hebben door zuivering een zure phosphatase uit *Escherichia coli* verkregen en kunnen aantonen, dat hiervoor glucose 1-phosphaat en glucose 6-phosphaat de beste substraten waren.

Wanneer de substraatspecificiteit in aanwezigheid van KCl (eindconcentratie: 140 mM) bij pH 3,6 werd nagegaan, bleek dat naast p-nitrophenylphosphaat alleen acetylphosphaat gehydrolyseerd werd.

TABEL XXI Substraatspecificiteit van de zure phosphatase bij pH 2,5 en de anion-gestimuleerde phosphatase bij pH 3,6 van *Escherichia coli*.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l:

Bij pH 2,5: glycine-HCl (pH 2,5); substraat 7,5.

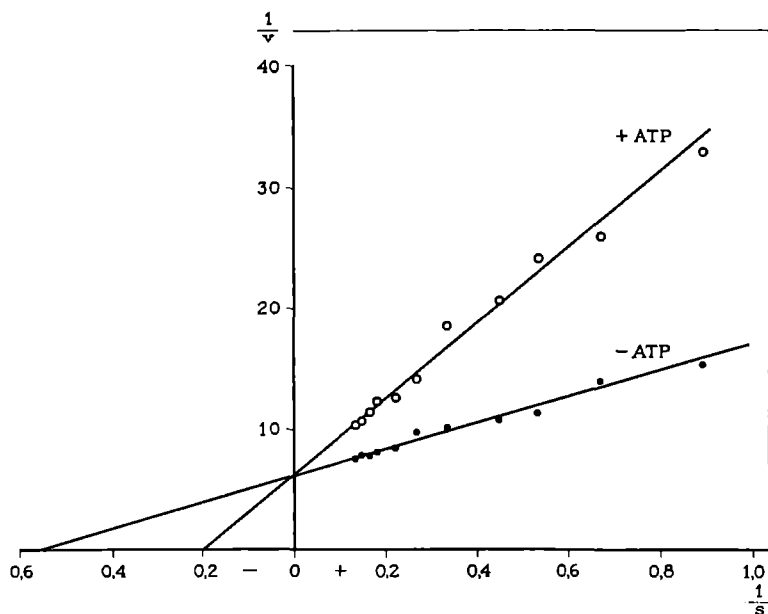
Bij pH 3,6: barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; substraat 7,5. Eindconcentratie KCl: 140 mM. Bacteriën: 0,025 mg.

Activiteit uitgedrukt in molen substraat gesplitst/kg droog gewicht . uur.

Substraat	Activiteit bij pH 2,5	Anion-gestimuleerde activiteit bij pH 3,6
p-nitrophenylphosphaat	3,92	1,97
glucose 1-phosphaat	0,33	0,01
glucose 6-phosphaat	0,16	0
fructose 1-phosphaat	0,09	—
fructose 1,6-diphosphaat	1,84	0
3-phosphoglycerinezuur	0,17	—
2,3-diphosphoglycerinezuur	3,79	0**
phosphoenolpyruvaat	0,32	—
adenosinetriphosphaat	0,39	0,01
adenosinediphosphaat	0,20	0,05
adenosinemonophosphaat	0,02	0,01
acetylphosphaat*	1,14	0,87

* Bepaald volgens de methode van Lipmann en Tuttle (1945).

** Afname in activiteit van 63%.



FIGUUR 30 Snelheid van de hydrolyse van p-nitrophenylphosphaat bij pH 2,5 als functie van de concentratie van p-nitrophenylphosphaat in afwezigheid en aanwezigheid van ATP.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: glycine-HCl (pH 2,5) 85; p-nitrophenylphosphaat 1,1 tot 7,5. Bacteriën: 0,025 mg. Eindconcentratie ATP: 0,3 mM.

VIII.8 Reactiesnelheid van de zure phosphatase als functie van de substraatconcentratie

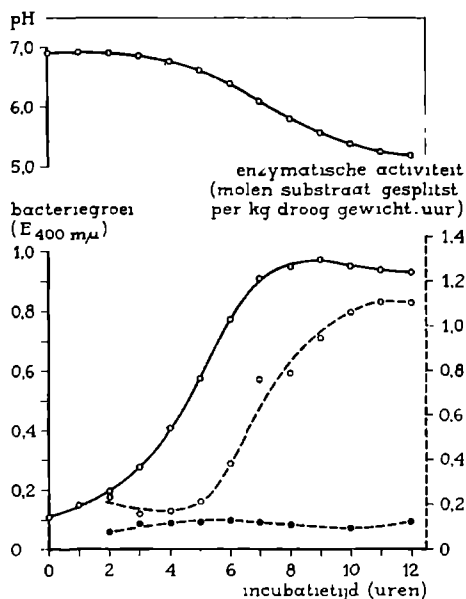
De invloed van de concentratie van p-nitrophenylphosphaat op de activiteit van de zure phosphatase is in figuur 30 weergegeven. De Michaelis constante, K_m , berekend uit deze figuur (Lineweaver en Burk, 1934) was $1,8 \times 10^{-3}$ M, wat vrijwel identiek is met de K_m waarde ($1,3 \times 10^{-3}$ M), die Rogers en Reithel (1960) verkregen hebben voor de phosphatase IIc-1 met hetzelfde substraat. ATP (0,3 mM) was een competitieve remmer voor de zure phosphatase (figuur 30); de K_m waarde in aanwezigheid van de remmer was $5,2 \times 10^{-3}$ M.

VIII.9 Relatie van de zure phosphatase tot het (Na^+-K^+) -ATPase systeem

Door de in bovenstaande paragrafen beschreven experimenten werd de indruk gevestigd, dat de zure phosphatase geen onderdeel is van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem zoals de K^+ -gestimuleerde phosphatase in zoogdierweefsels. Om dit expliciet te bewijzen werden experimenten uitgevoerd, die er op gericht waren een verschil in beide enzymen duidelijk te demonstreren.

VIII.9.1 (Na^+/K^+)-ATPase en anion-gestimuleerde phosphatase gedurende de groei van de bacteriën

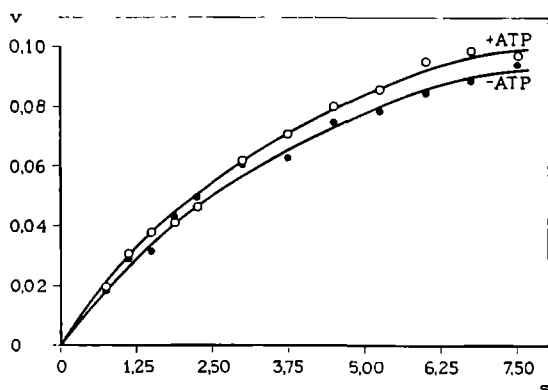
Een duidelijk verschil tussen beide enzymactiviteiten blijkt uit figuur 31. De specifieke (Na^+/K^+)-ATPase activiteit bleef praktisch constant gedurende de groei van de bacteriën van de „lag” phase tot de stationaire phase. De anion-gestimuleerde phosphatase gaf echter een ander beeld te zien. Tijdens de logaritmische groeifase nam de specifieke activiteit toe parallel aan de vermeerdering van het aantal bacteriecellen. In het stationaire deel van de groeicurve werd de hoogste enzymatische activiteit verkregen; in deze phase was de phosphatase activiteit constant. Dit was evenzeer het geval voor de zure phosphatase



FIGUUR 31 (Na^+/K^+)-ATPase activiteit, anion-gestimuleerde phosphatase activiteit en pH gedurende de groei van *Escherichia coli*.

De (Na^+/K^+)-ATPase activiteit (●-----●) werd bepaald volgens methode I met medium A (totale ATPase activiteit) en medium E (rest ATPase activiteit). De (Na^+/K^+)-ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen de totale ATPase en de rest ATPase activiteiten. Bacteriën werden voorbehandeld met 1,5 M ureum. Bacteriën: 0,4 mg.

Samenstelling van het incubatiemedium voor de anion-gestimuleerde phosphatase (o-----o) in mmol/l: barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; p-nitrophenylphosphaat 7,5; Bacteriën: 0,025 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM. De toename van het aantal cellen werd bepaald door meten van de extinctie bij 400 mμ (o-----o). Gedurende de groei werd de pH van het medium gemeten (o-----o).



FIGUUR 32 Snelheid van de hydrolyse van p-nitrophenylphosfaat in aanwezigheid van 140 mM KCl als functie van de concentratie van p-nitrophenylphosfaat in afwezigheid of aanwezigheid van ATP.

Samenstelling van het incubatiemedium in mmol/l: barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; p-nitrophenylphosfaat 0,75 tot 7,5. Bacteriën: 0,025 mg. Eindconcentratie KCl: 140 mM. Eindconcentratie ATP: 0,3 mM.

tase activiteit bij pH 2,5 (gemeten in afwezigheid van KCl). Hieruit kunnen we concluderen, dat de zure phosphatase een geïnduceerd enzym is, terwijl de (Na⁺-K⁺)-ATPase constitutief is.

VIII.9.2 Invloed van Mg²⁺ ionen op de (Na⁺-K⁺)-ATPase en de anion-gestimuleerde phosphatase

Zoals reeds in III.5 is beschreven, is Mg²⁺ een essentiële cofactor voor (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit. Mg²⁺ ionen hebben geen invloed op de zure phosphatase, gemeten zowel bij pH 2,5 als bij pH 3,6 in afwezigheid en aanwezigheid van KCl. Von Hofsten en Porath (1962) hadden reeds geconstateerd, dat Mg²⁺ ionen geen effect hebben op de zure phosphatase van *Escherichia coli*.

VIII.9.3 Invloed van p-nitrophenylphosfaat op de (Na⁺-K⁺)-ATPase en van ATP op de anion-gestimuleerde phosphatase

In VIII.8 is reeds vermeld, dat ATP de zure phosphatase activiteit bij pH 2,5 competitief remt. De activiteit van de anion-gestimuleerde phosphatase als functie van de substraatconcentratie is weergegeven in figuur 32. Zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van ATP (0,3 mM) werden praktisch samenvalende curven verkregen, waaruit geconcludeerd kan worden, dat ATP geen in-

vloed had op de anion-gestimuleerde phosphatase activiteit. Evenmin had p-nitrophenylphosphaat (7,5 mM) enig effect op de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit.

VIII.9.4 Enzympatroon na osmotische „shock”

Een vierde mogelijkheid om de relatie van het (Na⁺-K⁺)-ATPase systeem en de anion-gestimuleerde phosphatase te bestuderen is de localisatie van beide enzymen in de cel na te gaan. Neu en Heppel (1964) hebben een methode beschreven om een aantal enzymen selectief uit *Escherichia coli* vrij te maken door middel van een z.g. osmotische „shock”. Daarvoor worden de cellen opgenomen in een hypertoon medium (20 % sucrose), dat EDTA bevat, waardoor zij inkrimpen en het cytoplasmatisch membraan loslaat van de celwand. Dit proces wordt plasmolyse genoemd. Door de bacteriecellen daarna over te brengen in een hypotoon medium (water), waardoor de osmotische druk plotseling verlaagd wordt, zullen de cellen zwellen. De plasmolyseruimte verdwijnt en een aantal enzymen en uv-absorberend materiaal komen in het medium (water) terecht. Hierbij worden vooral een aantal hydrolytische enzymen vrijgemaakt (Heppel, 1967), waartoe ook een niet-specifieke, zure phosphatase en een hexose phosphatase behoren (Dvorak c.s., 1967).

Tabel XXII laat zien, wat de invloed van deze osmotische „shock” op *Esche-*

TABEL XXII Verdeling van de enzymatische activiteit in *Escherichia coli* na osmotische „shock”.

Samenstelling van de incubatiemedia in mmol/l:

Zure phosphatase activiteit bij pH 2,5: glycine-HCl (pH 2,5) 85; p-nitrophenylphosphaat 7,5. Eiwit ~ 10 µg.

Zure phosphatase activiteit bij pH 3,6: barnsteenzuur-Tris (pH 3,6) 85; p-nitrophenylphosphaat 7,5. Eindconcentratie KCl: 140 mM. Eiwit ~ 10 µg.

Mg²⁺-ATPase activiteit bij pH 8,7: Tris-HCl (pH 8,7) 200; Mg²⁺ 2; EDTA 0,1; ATP 2. Eiwit ~ 110 µg.

De bepaling van de (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit werd uitgevoerd volgens methode II met medium A (totale ATPase activiteit) en medium D. De (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit werd berekend uit het verschil tussen medium A en medium D. Eiwit ~ 110 µg. Activiteiten uitgedrukt in molen substraat gesplitst/kg eiwit . uur.

	Intacte bacteriën	Behandelde bacteriën	„Shock fluid”
Zure phosphatase pH 2,5	7,4	2,5	40,9
Anion-gestimuleerde phosphatase pH 3,6	2,7	1,0	36,0
Mg ²⁺ -ATPase pH 8,7	3,4	3,9	1,1
(Na ⁺ -K ⁺)-ATPase	0,2	0,1	0,1

richia coli K-12 was. De zure phosphatase werd hierbij vrijgemaakt, wat gepaard ging met een verhoging van de specifieke activiteit met een factor 5–6. Hetzelfde was het geval voor de anion-gestimuleerde phosphatase bij pH 3,6, waarbij een activiteitsverhoging van ca. 13 maal werd waargenomen. Beide enzymatische activiteiten waren verminderd in bacteriecellen, die de osmotische „shock” ondergaan hadden. De (Na⁺-K⁺)-ATPase activiteit en de daarmee nauw verbonden Mg²⁺-ATPase activiteit konden op deze manier echter niet vrijgemaakt worden. Neu en Heppel (1965) waren van mening dat ook een ATPase vrijgemaakt werd, maar uit onze resultaten blijkt, dat dit niet het geval is.

VIII.10 Discussie

In *Escherichia coli* komen twee phosphatasen met verschillend pH optimum voor. Een alkalische phosphatase met een pH optimum tussen 9,3 en 9,5 werd aangetoond in cellen, die gekweekt waren in een medium, waarin anorganisch fosphaat de beperkende factor was (Torriani, 1960; Horiuchi c.s., 1959). Dit is geen algemene eigenschap van *Escherichia coli*, want in zeven van de tien onderzochte *Escherichia coli* stammen is een alkalische phosphatase aangetoond, waarvan de synthese geen repressie ondervond van anorganisch fosphaat (Kuo en Blumenthal, 1961a). In onze experimenten met *Escherichia coli* K-12, waarbij de bacteriën geoogst werden uit een groeimedium, dat 62 mM anorganisch fosphaat bevatte, konden wij geen alkalische phosphatase aantonen. Evenmin was een phosphatase activiteit aanwezig, die bij neutrale pH door K⁺ ionen gestimuleerd wordt. Alleen een zure phosphatase kon aangetoond worden.

In *Escherichia coli* komen verschillende typen van zure phosphatase voor met pH optima variërend van 2,6 tot 6,0. Deze werden verkregen met een aantal stammen en onder verschillende groeiomstandigheden voor de bacteriën. Wij hebben met het in II.1 beschreven groeimedium uitsluitend een zure phosphatase met een pH optimum van 2,5 uit *Escherichia coli* K-12 kunnen verkrijgen. Blijkbaar bepalen de groeiomstandigheden, welk type zure phosphatase gevormd wordt.

De zure phosphatase kon bij pH 3,6 door anionen gestimuleerd worden. Activering door anionen is een effect, dat bij verschillende enzymen is waargenomen en in het algemeen als een niet-specifiek effect beschouwd wordt. Het meest bekende voorbeeld is α -amylase (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC. 3.2.1.1) (Myrbäck, 1926), waarbij chloride een verhoging van de activiteit teweeg brengt. Bi- en trivalente anionen hebben eenzelfde invloed op fumarase (L-malate hydro-lyase, EC. 4.2.1.2) (Massey, 1953). De invloed van deze anionen op de en-

zymen wordt veroorzaakt door een verandering van de ionisatieconstanten van sommige groepen in het actief centrum van het enzym. Hierdoor wordt de ligging van één of van beide zijden van de pH-activiteitscurve beïnvloed. Zo toonde Myrbäck (1926) aan, dat chloride en bromide alleen het rechter deel van de pH-activiteitscurve van α -amylase veranderden, terwijl iodide, nitraat en chlooraat op beide zijden een invloed hadden, zodat de gehele pH-activiteitscurve naar hogere pH verschoof. Voor arylsulphatase (aryl-sulphate sulphohydrolase, EC. 3.1.6.1) konden Webb en Morrow (1959) geen verandering in de ligging van het pH optimum aantonen door toevoeging van chloride. Deze ionen hadden geen effect op de affiniteit van arylsulphatase voor het substraat, maar wel op de afbraak van het enzym-substraat complex. In het geval van de drie genoemde enzymen α -amylase, fumarase en arylsulphatase was de pH-activiteitscurve in afwezigheid van toegevoegde anionen symmetrisch. Ook in aanwezigheid van anionen bleef de gehele curve symmetrisch. De pH-activiteitscurve voor de zure phosphatase van *Escherichia coli* was in afwezigheid van KCl geheel symmetrisch, maar deze symmetrie ging verloren door toevoegen van KCl. Dit is een aanwijzing, dat hier van een ander mechanisme sprake is. De invloed van anionen op de zure phosphatase is niet verder bestudeerd, omdat dit buiten het bestek van ons onderzoek viel.

Von Hofsten (1961) constateerde bij groei van *Escherichia coli* in een glucosehoudend medium een geleidelijke afname van de specifieke activiteit van de zure phosphatase tijdens de logarithmische groeifase. Hij concludeerde, dat glucose als een repressor werkt op de synthese van de zure phosphatase, terwijl daarentegen succinaat of glycerol de vorming van het enzym bevordert. Tijdens de groei van de bacteriën daalde de pH van ons groeimedum van 7,0 tot 5,2, doordat stofwisselingsproducten van de cellen in het medium terechtkwamen. Dit kan verklaren, waarom wij in tegenstelling tot von Hofsten (1961) een toename van de specifieke activiteit van de zure phosphatase tijdens de logarithmische groeifase geconstateerd hebben. Blijkbaar is de verhoging van de synthese van de zure phosphatase een adaptatie van de cellen aan het veranderde groeimedum.

De zure phosphatase vertoont geen overeenkomst met de K^+ -gestimuleerde phosphatase, gemeten bij pH 7,5, welke een deel vormt van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in vele dierlijke weefsels. Hiervoor kunnen de volgende argumenten aangevoerd worden:

1. De pH optima van beide enzymen verschillen aanzienlijk.
2. Mg^{2+} is geen essentiële cofactor voor de zure phosphatase, daarentegen wel voor de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit.
3. Het activerende effect van KCl op de zure phosphatase bij pH 3,6 wordt veroorzaakt door het anion en niet door het kation.

4. Vervanging van K^+ ionen door Na^+ ionen remt de toename van de phosphatase activiteit bij pH 3,6 niet.
5. De toename van de phosphatase activiteit bij pH 3,6 wordt niet door ouabaine geremd.
6. ATP remt de anion-gestimuleerde phosphatase evenmin als p-nitrophenylphosfaat de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit remt.
7. De subcellulaire verdeling van beide enzymen is verschillend. De zure phosphatase kan door een osmotische „shock” uit de bacteriecel vrijgemaakt worden, terwijl de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit achterblijft. We mogen dan ook concluderen, dat de zure phosphatase in *Escherichia coli* geen directe relatie heeft met het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in dit micro-organisme.

SAMENVATTING

Cellen bevatten in het algemeen een hoog kalium- en een laag natriumgehalte, terwijl het omgekeerde geldt voor de extracellulaire vloeistof. Door dit grote concentratieverschil zullen K^+ ionen uit de cel lekken, terwijl Na^+ ionen naar binnen zullen gaan. Dit is het z.g. passieve transport, waarvoor geen energie vereist is. Om echter het concentratieverschil van Na^+ en K^+ ionen tussen de cel en de omringende vloeistof te handhaven moeten K^+ ionen tegen de elektrochemische gradiënt in de cel binnen gepompt worden en Na^+ ionen naar buiten gepompt worden. Voor dit proces is energie nodig, welke geleverd wordt door de hydrolytische splitsing van ATP tot ADP en P_i door middel van een enzymstelsel, dat met Mg^{2+} als cofactor ATP kan hydrolyseren. Maximale activiteit van deze Mg^{2+} -geactiveerde ATPase wordt verkregen als Na^+ en K^+ ionen tezamen aanwezig zijn. Dit (Na^+-K^+) -ATPase systeem kan geremd worden door hartglycosiden, zoals ouabaine. Tussen de opname van K^+ ionen en afgifte van Na^+ ionen enerzijds en het (Na^+-K^+) -ATPase systeem anderzijds zijn vele overeenkomstige eigenschappen gevonden in een aanzienlijk aantal weefsels.

In hoofdstuk I wordt een overzicht gegeven van het huidige inzicht in het transportmechanisme van Na^+ en K^+ ionen. Een aantal eigenschappen van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem alsmede de relatie tot het transport van de beide kationen worden besproken. Doelstelling van het onderzoek was na te gaan of het actief transport en het (Na^+-K^+) -ATPase systeem, die in vele dierlijke weefsels voorkomen, ook in micro-organismen aanwezig zijn. Het onderzoek werd uitgevoerd met *Escherichia coli* stam K-12.

Na een overzicht over de gebruikte methoden in hoofdstuk II wordt in hoofdstuk III de aanwezigheid van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem aangetoond en zijn de belangrijkste eigenschappen beschreven. Aangezien met de gebruikelijke werkwijze slechts een zeer gering percentage van de totale ATPase door Na^+ en K^+ ionen tezamen activeerbaar was, werd gezocht naar een methode om dit percentage te vergroten. Als de gelyophiliseerde bacteriën voorbehandeld werden met ureum, verminderde de Mg^{2+} -geactiveerde ATPase activiteit (rest ATPase), maar de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit bleef constant. De maximale activering door Mg^{2+} en K^+ ionen, pH optimum en substraatspecificiteit werden bepaald in het met ureum behandelde preparaat. Bij vervanging van Na^+ ionen door andere monovalente kationen bleek duidelijk, dat de in *Escherichia coli* voorkomende Mg^{2+} -ATPase door één enkel monovalent kation gestimuleerd kan worden.

In hoofdstuk IV worden een aantal eigenschappen van deze Mg^{2+} -ATPase beschreven. Over het gehele gemeten pH traject van 6,0 tot 9,5 had KCl in afwezigheid van Na^+ een stimulerende invloed op de Mg^{2+} -ATPase activiteit. Deze stimulerende invloed werd niet alleen door K^+ ionen maar door alle monovalente kationen veroorzaakt; cholinechloride had echter geen effect. Van deze Mg^{2+} -ATPase werden de substraatspecificiteit, de K_m waarde, het temperatuuroptimum, de activeringsenergie en de vervanging van Mg^{2+} door andere bivalente kationen bestudeerd. De eigenschappen van deze Mg^{2+} -ATPase moesten geheel bekend zijn om een nauwkeurige bepaling van de (Na^+-K^+) -ATPase activiteit, zo deze aanwezig was, mogelijk te maken.

In hoofdstuk V werd dit probleem opgelost door invoering van verdere incubatiemedia. Ouabaine, dat een remmer is van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem, remde niet de Mg^{2+} -ATPase activiteit noch de stimulering van de Mg^{2+} -ATPase door Na^+ of K^+ ionen. Alleen wanneer Mg^{2+} , Na^+ en K^+ ionen tezamen in het incubatiemedium aanwezig waren, werd een remming door ouabaine geconstateerd. Dit resultaat betekent, dat in *Escherichia coli* (Na^+-K^+) -ATPase activiteit aanwezig is, waarvan de absolute activiteit 0,24 mol ATP gesplitst/kg droog gewicht . uur bedraagt. Op grond van literatuurgegevens over de gemiddelde K^+ influx in *Escherichia coli*, kon het aantal K^+ ionen opgenomen per molecuul ATP, dat door het (Na^+-K^+) -ATPase systeem gesplitst wordt, berekend worden. In *Escherichia coli* blijkt deze verhouding 1,4 tot 2,8 te zijn, welke goed overeenkomt met de waarden gevonden voor een reeks verschillende dierlijke weefsels.

Het (Na^+-K^+) -ATPase systeem is het pompmechanisme voor het transport van Na^+ en K^+ ionen via de celmembraan in vele weefsels. Om te bepalen of dit ook het geval is voor *Escherichia coli*, werd de invloed van verschillende remstoffen, waaronder ouabaine, op het natrium- en kaliumgehalte van de bacteriecellen bestudeerd (hoofdstuk VI). Door toevoegen van ouabaine aan het groeimedium werd een verhoging van het natriumgehalte en een verlaging van het kaliumgehalte verkregen. De groei van de bacteriën in een medium met een zeer lage K^+ concentratie kon geremd worden door toevoegen van ouabaine. Daarmee is een relatie gelegd tussen het (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het actief transport van Na^+ en K^+ ionen.

Een derde mogelijkheid het transport van de kationen te onderzoeken is gelegen in een bestudering van de actieve K^+ influx, waarvan de resultaten in hoofdstuk VII vermeld zijn. Dit proces werd bestudeerd met behulp van $^{86}Rb^+$, dat zich zeer analoog aan K^+ gedraagt. Door het bepalen van verschillende eigenschappen van deze $^{86}Rb^+$ opname, zoals pH-afhankelijkheid, K^+ -afhankelijkheid, Na^+ -afhankelijkheid en de invloed van diverse remmers werd het duidelijk, dat bij neutrale pH een opname van $^{86}Rb^+$ plaats vond, welke voor-

namelijk als een Rb^+-H^+ uitwisseling beschouwd moet worden. Door verlaging van de pH was het mogelijk deze Rb^+-H^+ uitwisseling grotendeels uit te schakelen en daardoor de Rb^+-Na^+ uitwisseling te laten prevaleren. De $^{86}\text{Rb}^+$ opname werd bij pH 5,3 door toevoegen van ouabaine met ongeveer 10% geremd. Dit was een verder bewijs van de aanwezigheid van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem en het daarmee verbonden actief transport in *Escherichia coli*.

In vele dierlijke weefsels is een phosphatase activiteit gevonden, welke door K^+ ionen gestimuleerd kan worden en een onderdeel vormt van het (Na^+-K^+) -ATPase systeem. Deze K^+ -afhankelijke phosphatase wordt door Na^+ ionen en door ouabaine geremd. In *Escherichia coli* werd deze phosphatase activiteit niet gevonden, wel echter een zure phosphatase met een pH optimum bij 2,5. In hoofdstuk VIII zijn een aantal eigenschappen van deze phosphatase vermeld. Bij pH 3,6 hadden anionen een stimulerende invloed op deze enzymatische activiteit. De eigenschappen van deze anion-gestimuleerde phosphatase werden vergeleken met de eigenschappen van de (Na^+-K^+) -ATPase in *Escherichia coli* en met de K^+ -gestimuleerde phosphatase van verschillende zoogdierweefsels. Uit de resultaten werd duidelijk, dat de anion-gestimuleerde phosphatase geen directe relatie had met het (Na^+-K^+) -ATPase systeem in *Escherichia coli*.

SUMMARY

In general, cells contain a high potassium and low sodium content, whereas the reverse is true for the extracellular fluid. As result of the concentration gradients, K^+ ions will leak out of the cells and Na^+ ions will leak in. This is a passive process for which no energy is required. To maintain the difference in sodium and potassium content between the cell and the surrounding fluid, K^+ ions must be pumped into the cell and Na^+ ions out against the concentration gradient. For this process energy is required and this is obtained by the hydrolytic splitting of ATP to ADP and Pi by means of an enzyme system, which can hydrolyse ATP with Mg^{2+} as a cofactor. Maximal activity is obtained when Na^+ and K^+ ions are present together. This (Na^+-K^+) -ATPase system can be inhibited by cardiac glycosides such as ouabain. Several similarities between the K^+ uptake and Na^+ extrusion and the (Na^+-K^+) -ATPase system, have been demonstrated in a considerable number of tissues.

In chapter I a survey is made of modern insight in the transport mechanism of Na^+ and K^+ ions. A number of the properties of the (Na^+-K^+) -ATPase system as the transport of both cations are discussed. The purpose of the present investigation was to find out whether the (Na^+-K^+) -ATPase system, which has been demonstrated in many animal tissues, is also present in micro-organisms. *Escherichia coli*, strain K-12, was therefore chosen.

After a survey in chapter II of the methods used, the presence of the (Na^+-K^+) -ATPase system is demonstrated and its major properties are described in chapter III. Since with the commonly used methods only a very low percentage of the total ATPase was found to be activated by Na^+ and K^+ ions together, a means was sought to increase this percentage. When lyophilized bacteria were pretreated with urea, the Mg^{2+} -activated ATPase activity (rest ATPase) decreased, while the (Na^+-K^+) -ATPase activity remained constant. The maximal activation by Mg^{2+} and K^+ ions, the pH optimum and the substrate specificity were determined in the urea-treated preparation. Upon substitution of Na^+ ions by other monovalent cations it became clear that the Mg^{2+} -ATPase present in *Escherichia coli* can be activated by one monovalent cation.

In chapter IV a number of the properties of this Mg^{2+} -ATPase is described. Over the entire measured pH range (6.0–9.5) KCl (in the absence of Na^+) had a stimulating effect on the Mg^{2+} -ATPase activity. This stimulating effect was not only given by K^+ ions but by all monovalent cations; cholinechloride did not have any effect. The substrate specificity, K_m value, temperature optimum,

activation energy and replacement of Mg^{2+} by other bivalent cations have been studied. It was important to know the properties of this Mg^{2+} -ATPase activity in order to allow an exact determination of the (Na^+-K^+) -ATPase activity present, if any.

In chapter V this problem is solved by the introduction of additional incubation media. Ouabain, which is an inhibitor of the (Na^+-K^+) -ATPase system, did not inhibit the Mg^{2+} -ATPase activity, nor the stimulation of the Mg^{2+} -ATPase by Na^+ or K^+ ions separately. Inhibition by ouabain could only be demonstrated, when Mg^{2+} , Na^+ and K^+ ions were present together in the incubation medium. It can therefore be concluded that (Na^+-K^+) -ATPase activity is present in *Escherichia coli*. The absolute activity of this enzyme is 0.24 mol ATP hydrolyzed/kg dry weight . hr. From literature data on the average K^+ influx in *Escherichia coli* the number of K^+ ions taken up per molecule ATP, which is hydrolyzed by the (Na^+-K^+) -ATPase system, can be calculated. In *Escherichia coli* the ratio amounts to 1.4 to 2.8, which agrees well with the values found for a variety of animal tissues.

The (Na^+-K^+) -ATPase system is the pump system for the transport of Na^+ and K^+ ions across the cell membrane in many animal tissues. In order to establish whether this hold true for *Escherichia coli* the influence of different inhibitors, including ouabain, on the sodium and potassium content of the bacteria-cells, has been studied (chapter VI). By adding ouabain to the growth medium an increase of the sodium and a decrease of the potassium content has been demonstrated. The growth of the bacteria in a medium with a very low concentration of K^+ ions could be inhibited by adding ouabain. Thus a relationship has been found between the (Na^+-K^+) -ATPase activity and the active transport of Na^+ and K^+ ions.

A third possibility for investigation of the transport of the cations is to study the active K^+ influx, the results of which are reported in chapter VII. The process was studied with $^{86}Rb^+$, which behaves very similarly to K^+ . By determining the different properties of the $^{86}Rb^+$ uptake, such as the dependence of pH, K^+ ions, Na^+ ions and the influence of different inhibitors, it was obvious that at neutral pH the uptake of $^{86}Rb^+$ could mainly be considered as a Rb^+-H^+ exchange. By decreasing the pH it was possible to partly eliminate this Rb^+-H^+ exchange. At pH 5.3 the $^{86}Rb^+$ uptake was inhibited by ouabain by about 10%. This was further evidence for the (Na^+-K^+) -ATPase system in *Escherichia coli* and for its role in the active transport of Na^+ and K^+ .

In many animal tissues a phosphatase activity has been demonstrated at neutral pH, which can be stimulated by K^+ ions and which forms part of the (Na^+-K^+) -ATPase system. The K^+ -dependent phosphatase activity is inhibited by Na^+ ions and by ouabain. Such a phosphatase activity could not be demon-

strated in *Escherichia coli*. There was however, a phosphatase activity with a pH optimum at 2.5. In chapter VIII a number of the properties of this phosphatase activity is reported. At pH 3.6 anions had a stimulating effect on this enzyme activity. The properties of this anion-stimulated phosphatase were compared with the properties of the (Na⁺-K⁺)-ATPase in *Escherichia coli* and with the K⁺-stimulated phosphatase in different animal tissues. From these results it can be concluded that the anion-stimulated phosphatase has no direct relation with the (Na⁺-K⁺)-ATPase system in *Escherichia coli*.

LITERATUUR

- ABRAMS, A. 1965. The release of bound adenosinetriphosphatase from isolated bacterial membranes and the properties of the solubilized enzyme. *J. Biol. Chem.*, **240**: 3675.
- ABRAMS, A. en C. BARON. 1967. The isolation and subunit structure of Streptococcal membrane adenosinetriphosphatase. *Biochemistry (Wash.)*, **6**: 225.
- ABRAMS, A., P. MCNAMARA en F. B. JOHNSON. 1960. Adenosinetriphosphatase in isolated bacterial cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **235**: 3659.
- AHMED, K. en J. D. JUDAH. 1964. Preparation of lipoproteins containing cation dependent ATP-ases. *Biochim. Biophys. Acta*, **93**: 603.
- AHMED, K. en J. D. JUDAH. 1965. Identification of active phosphoprotein in a cation-activated adenosinetriphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **104**: 112.
- ALBERS, R. W., S. FAHN en G. J. KOVAL. 1963. The role of Na ions in the activation of *Electrophorus electricus* organ adenosinetriphosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **50**: 474.
- ALBERS, R. W. en G. J. KOVAL. 1962. Properties of the sodium dependent ATPase of *Electrophorus electricus*. *Life Sciences*, **1**: 219.
- ALBERS, R. W. en G. J. KOVAL. 1966. Sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase of *Electrophorus electricus* organ. III An associated potassium-activated neutral phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **241**: 1896.
- ALBERS, R. W., G. J. KOVAL en G. J. SIEGEL. 1968. Studies on the interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. *Mol. Pharmacol.*, **4**: 324.
- ALBERS, R. W., G. R. DE LORES ARNAIZ en E. DE ROBERTIS. 1965. Sodium-potassium-activated ATPase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase: A comparison of their subcellular localizations in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**: 557.
- ARMSTRONG, W. MCD. en A. ROTHSTEIN. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I Effect of pH on uptake. *J. Gen. Physiol.*, **48**: 61.
- BADER, H. en A. K. SEN. 1966. (K⁺)-dependent acylphosphatase as part of the (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase of cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 116.
- BADER, H., A. K. SEN en R. L. POST. 1966. Isolation and characterization of a phosphorylated intermediate in the (Na⁺-K⁺) system-dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 106.
- BAKER, P. F. 1963. The relationship between phosphorus metabolism and sodium pump in intact nerve. *Biochim. Biophys. Acta*, **75**: 287.
- BAKERS, P. F. 1966. The sodium pump. *Endeavour*, **25**: 166.
- BAKKEREN, J. A. J. M. en S. L. BONTING. 1968a. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated ATPase. XX Properties of (Na⁺-K⁺)-activated ATPase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**: 460.
- BAKKEREN, J. A. J. M. en S. L. BONTING. 1968b. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated ATPase. XXI Changes in (Na⁺-K⁺)-activated ATPase activity and ouabain-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake rate in regenerating rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**: 467.
- BLACK, S. 1951. Yeast aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**: 86.
- BLOCK, J. B. en S. L. BONTING. 1964. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XIII Sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase and cation transport in normal and leukemic human leukocytes. *Enzymol. biol. clin.*, **4**: 183.
- BONTING, S. L. 1964. Na-K activated ATPase and active cation transport p. 35. In J. de Graeff en B. Leynse (ed.), *Water en electrolyte metabolism II*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
- BONTING, S. L. 1966. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XV The rectal gland of the elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **17**: 953.
- BONTING, S. L., en B. BECKER. 1964. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XIV Inhibition of enzyme activity and aqueous humor flow in the rabbit eye after intravitreal injection of ouabain. *Invest. Ophthalmol.*, **3**: 523.

- BONTING, S. L. en M. R. CANADY. 1964. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XII Na-K activated adenosinetriphosphatase and sodium transport in toad bladder. *Amer. J. Physiol.*, 207: 1005.
- BONTING, S. L. en L. L. CARAVAGGIO. 1962. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. III Sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase in the squid giant axon. *Nature*, 194 1180.
- BONTING, S. L. en L. L. CARAVAGGIO. 1963. Studeis on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. V Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 37.
- BONTING, S. L. en L. L. CARAVAGGIO. 1966. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XVI Its absence from the cation transport system of *Ulva lactuca*. *Biochim. Biophys. Acta*, 112 519.
- BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO en M. R. CANADY. 1964a. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. X Occurrence in retinal rods and relation to rhodopsin. *Exp. Eye Res.*, 3 47.
- BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO, M. R. CANADY en N. M. HAWKINS. 1964b. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. XI The salt gland of the herring gull. *Arch. Biochem. Biophys.*, 106 49.
- BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO en N. M. HAWKINS. 1962. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. IV Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98 413.
- BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO en N. M. HAWKINS. 1963. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. VI Its role in cation transport in the lens of cat, calf and rabbit. *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 47.
- BONTING, S. L., N. M. HAWKINS en M. R. CANADY. 1964c. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. VII Inhibition by Erythrophleum alkaloids. *Biochem. Pharmacol.*, 13 13.
- BONTING, S. L., K. A. SIMON en N. M. HAWKINS. 1961. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. I Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95 416.
- BOSE, S. K. en H. GEST. 1965. Properties of adenosinetriphosphatase in a photosynthetic bacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, 96 159.
- BOURKE, R. S. en D. B. TOWER. 1966. Fluid compartmentation and electrolytes of cat cerebral cortex *in vitro*. II Sodium, potassium and chloride of mature cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 13 1099.
- BOWLER, K. en C. J. DUNCAN. 1968. The temperature characteristics of the ATPases from a frog brain microsomal preparation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24 223.
- BRAGG, P. D en C. HOU. 1967. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidation in *Escherichia coli* particles. III Cellular location of menadione reductase and ATPase activities. *Canad. J. Biochem.*, 45 1107.
- BROWN, H. D. en A. M. ALTSCHUL. 1964. Glycoside-sensitive ATPase from *Arachis hypogaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15 479.
- BURNHAM, J. C. en G. J. HAGEAGE Jr. 1967. Adenosinephosphate hydrolases in cell fractions of *Vitreoscilla*. *J. Bact.*, 93. 191.
- CALDWELL, P. C. en R. D. KEYNES. 1959. The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)*, 148 8p.
- CHIGNELL, C. F. en E. TITUS. 1966. The effect of hydroxylamine on a Na⁺- and K⁺- requiring adenosinetriphosphatase from beef brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56 1620.
- CHRISTIAN, J. H. B. en J. A. WALTHO. 1961. The sodium en potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.*, 25 97.
- CHUNG-MEI LING, 1967. An anion stimulated particulate ATP phosphohydrolase (ATPase) from Bakers' Yeast. *Life Sciences*, 6 1077.

- COHN, M. en J. MONOD. 1951. Purification et propriétés de la β -galactosidase (lactase) d'*Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 7. 153.
- CONWAY, E. J. en F. DUGGAN. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. Biochem. J., 69: 265.
- DAVSON, H. en J. F. DANIELLI. 1943. The permeability of natural membranes, Cambridge.
- DODDS, J. J. A. en R. J. ELLIS. 1966. Cation-stimulated adenosinetriphosphatase activity in plant cell walls. Biochem. J., 101. 31p.
- DRAPEAU, G. R. en R. A. MACLEOD. 1963. Nutrition and metabolism of marine bacteria. XII Ion activation of adenosinetriphosphatase in membranes of marine bacterial cells. J. Bact., 85. 1413.
- DUNHAM, E. T. en I. M. GLYNN. 1961. Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. (Lond.), 156. 274.
- DVORAK, H. F., R. W. BROCKMAN en L. A. HEPPEL. 1967. Purification and properties of two acid phosphatase fractions isolated from osmotic shock fluid of *Escherichia coli*. Biochemistry, 6. 1743.
- DYDYNKA, M. en E. J. HARRIS. 1966. Consumption of high-energy phosphates during active sodium and potassium interchange in frog muscle. J. Physiol. (Lond.), 182. 92.
- EDWARDS, C. en E. J. HARRIS. 1957. Factors influencing the sodium movement in frog muscle with a discussion of the mechanism of sodium movement. J. Physiol. (Lond.), 135. 567.
- ELSBACH, P. en I. L. SCHWARTZ. 1959. Studies on the sodium and potassium transport in rabbit polymorphonuclear leukocytes. J. Gen. Physiol., 42. 883.
- ELSHOVE, A. en G. D. V. VAN ROSSUM. 1963. Net movements of sodium and potassium, and their relation to respiration, in slices of rat liver incubated *in vitro*. J. Physiol. (Lond.), 168. 531.
- EMMELOT, P. en C. J. BOS. 1966. Studies on plasma membranes. III Mg^{2+} -ATPase, $(Na^+-K^+-Mg^{2+})$ -ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 120. 369.
- EPSTEIN, W. en S. G. SCHULTZ. 1965. Cation transport in *Escherichia coli*. V Regulation of cation content. J. Gen. Physiol., 49. 221.
- EPSTEIN, W. en S. G. SCHULTZ. 1966. Cation transport in *Escherichia coli*. VI K exchange. J. Gen. Physiol., 49. 469.
- EPSTEIN, W. en A. K. SOLOMON. 1966. persoonlijke mededeling.
- ESTABROOK, R. W. en P. K. MAITRA. 1962. A fluorimetric method for the quantitative micro-analysis of adenine and pyridine nucleotides. Anal. Biochem., 3. 369.
- FAHN, ST., G. J. KOVAL en R. W. ALBERS. 1968. Sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase of *Electrophorus* electric organ. V Phosphorylation by adenosinetriphosphate- ^{32}P . J. Biol. Chem., 243. 1993.
- FISHER, R. A. en F. YATES. 1963. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver and Boyd, London.
- FORMBY, B. en J. CLAUSEN. 1968. Comparative studies of K^+ -p-nitrophenylphosphatase, K^+ -acylphosphatase and (Na^+-K^+) -adenosinetriphosphatase in synaptosomes of rat brain. Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 349. 909.
- FRANK, R. N. en T. H. GOLDSMITH. 1965. Adenosinetriphosphatase activity in the rod outer segments of the pig's retina. Arch. Biochem. Biophys., 110. 517.
- FUJITA, M., T. NAKAO, Y. TASHIMA, N. MIZUNO, K. NAGANO en M. NAKAO. 1966. Potassiumion stimulated p-nitrophenylphosphatase activity occurring in a highly specific adenosinetriphosphatase preparation from rabbit brain. Biochim. Biophys. Acta, 117. 42.
- GARDOS, G. 1954. Accumulation of K^+ ions in human blood cells. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 6. 191.
- GARDOS, G. 1964. Connection between membrane adenosinetriphosphatase activity and potassium transport in erythrocyte ghosts. Experientia, 20. 387.

- GIBBS, R., P. M. RODDY en E. J. TITUS. 1965. Preparation assay and properties of an Na^+ - and K^+ -requiring adenosinetriphosphatase from beef brain. *J. Biol. Chem.*, 240 2182.
- GLYNN, I. M. 1956. Sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 134 278.
- GLYNN, I. M. 1957. The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 136 148.
- GLYNN, I. M. 1962a. An adenosinetriphosphatase from electric organ activated by sodium and potassium inhibited by ouabain or oligomycin. *Biochem. J.*, 84 75p.
- GLYNN I. M. 1962b. Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J. Physiol. (Lond.)*, 160 18p.
- GLYNN, I. M., C. W. SLAYMAN, J. EICHBERG en R. M. C. DAWSON. 1965. The adenosinetriphosphatase system responsible for cation transport in electric organ: Exclusion of phospholipids as intermediates. *Biochem. J.*, 94 692.
- GREENAWALT, J. W., C. WEIBULL en H. LOW. 1962. The hydrolysis of adenosinetriphosphate by cell fractions of *Bacillus megaterium*. II Stimulation and inhibition of the enzymic activities. *J. Biol. Chem.*, 237 853.
- GROSS, R. en N. W. COLES. 1968. Adenosinetriphosphatase in isolated membranes of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.*, 95 1322.
- GRUENER, N. en Y. AVI-DOR. 1966. Temperature-dependence of activation and inhibition of rat-brain adenosinetriphosphatase activated by sodium and potassium ions. *Biochem. J.*, 100 762.
- GRUENER, N. en J. NEUMANN. 1966. An ion-stimulated adenosinetriphosphatase from bean roots. *Physiol. Plant.*, 19 678.
- GUNTHER, TH. en F. DORN. 1966a. Über die ATPase von *E. coli* B 163 und seiner K-Mangelmutante B 525. *Z. Naturforsch.*, 21b 1076.
- GUNTHER, TH. en F. DORN. 1966b. Über den K-Transport bei der K-Mangelmutante *E. coli* B 525. *Z. Naturforsch.*, 21b 1082.
- HAFKENSCHIED, J. C. M. 1968. Properties of an acid phosphatase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 167 582.
- HAFKENSCHIED, J. C. M. en S. L. BONTING. 1968a. Studies on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated ATPase. XIX Occurrence and properties of a $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated ATPase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 151 204
- HAFKENSCHIED, J. C. M. en S. L. BONTING. 1969. Studies on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated ATPase. A Mg^{2+} -ATPase in *Escherichia coli*, activated by monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, ter perse.
- HAYASHI, M. en R. UCHIDA. 1965. A cation activated adenosinetriphosphatase in cell membranes of halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 110 207.
- HEPPEL, L. A. 1967. Selective release of enzymes from bacteria. *Science*, 156 1451.
- HOFFMAN, J. F. 1960. The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. *Fed. Proc.*, 19 127.
- HOFSTEE, B. H. J. 1952. On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. *Science*, 116 329
- HOFSTEE, B. H. J. 1959. Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. *Nature*, 184 1296
- HOFSTEN, B. VON. 1961. Acid phosphatase and the growth of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 48 171
- HOFSTEN, B. VON en J. PORATH. 1962. Purification and some properties of an acid phosphatase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 64 1.
- HOKIN, M. R. 1963. Studies on a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -dependent, ouabain-sensitive adenosinetriphosphatase in the avian salt gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 77 108.
- HOKIN, M. R. en L. E. HOKIN. 1964. The synthesis of phosphatidic acid and proteinbound phosphorylserine in salt gland homogenates. *J. Biol. Chem.*, 239 2116.
- HOKIN, L. E., P. S. SASTRY, P. R. GALSWORTHY en A. YODA. 1965. Evidence that a phosphorylated

- intermediate in a brain transport adenosinetriphosphatase is an acyl phosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54 177.
- HOKIN, L. E. en A. YODA. 1964. Inhibition by diisopropylfluorophosphate of a kidney transport adenosinetriphosphatase by phosphorylation of a serine residue. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52 454.
- HORIUCHI, T., S. HORIUCHI en D. MIZUNO. 1959. A possible negative feedback phenomenon controlling formation of alkaline phosphomonoesterase in *Escherichia coli*. Nature, 183 1529.
- HURLBERT, R. B., H. SCHMITZ, A. F. BRUMM en V. R. POTTER. 1954. Nucleotide metabolism. II Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. J. Biol. Chem., 209 23.
- ISRAEL, Y. en E. TITUS. 1967. A comparison of microsomal (Na^+/K^+)-ATPase with K^+ -acetylphosphatase. Biochim. Biophys. Acta, 139 450.
- IZUMI, F., K. NAGAI en H. YOSHIDA. 1966. Studies on potassium dependent phosphatase. II Substrate specificity of the enzyme J. Biochem. (Tokyo), 60 533.
- JARNEFELT, J. 1962. Properties and possible mechanism of the Na^+ and K^+ -stimulated microsomal adenosinetriphosphatase. Biochim. Biophys. Acta, 59 643.
- JOHNSON, J. A. 1956. Influence of ouabain, strophanthidin and dihydrostrophanthidin on sodium and potassium transport in frog sartorii. Amer. J. Physiol., 187 328.
- JUDAH, J. D., K. AHMED en A. E. M. MCLEAN. 1962. Ion transport and phosphoproteins of human red cells. Biochim. Biophys. Acta, 65 472.
- KAHLENBERG, A., P. R. GALSORTHY en L. E. HOKIN. 1967. Sodium-potassium adenosinetriphosphatase. acyl phosphate „intermediate” shown to be L-glutamyl- γ -phosphate. Science, 157 434.
- KASBEKAR, D. K. en R. P. DURBIN. 1965. An adenosinetriphosphatase from frog gastric mucosa. Biochim. Biophys. Acta, 105 472.
- KATZ, A. I. en F. H. EPSTEIN. 1967. The role of sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. J. Clin. Invest., 46 1999.
- KEYNES, R. D. 1961. The energy source for active transport in nerve and muscle, p 131. In A. Kleinzeller and A. Kotyk (ed.), Membrane transport and metabolism, Academic Press, New York.
- KLEBER, H. P. en H. AURICH. 1967. Evidence for an inducible active transport of carnitine in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26 255.
- KUO, M. H. en H. J. BLUMENTHAL. 1961a. Absence of phosphatase repression by inorganic phosphate in some micro-organisms. Nature, 190 29.
- KUO, M. H. en H. J. BLUMENTHAL. 1961b. Purification and properties of an acid phosphomonoesterase from *Neurospora crassa* Biochim. Biophys. Acta, 52 13.
- KUROKAWA, M., T. SAKAMOTO en M. KATO. 1965. Distribution of sodium-plus-potassium-stimulated adenosinetriphosphatase activity in isolated nerve-ending particles. Biochem. J., 97 833.
- KUYPERS, W., A. C. VAN DE VLEUTEN en S. L. BONTING. 1967. Studies on (Na^+/K^+)-activated adenosinetriphosphatase. XVIII Cochlear function and sodium and potassium activated adenosinetriphosphatase. Science, 157 949.
- LACEY, O. L. 1957. Statistical methods in experimentation. The Macmillan Co., New York.
- LANGHAM, M. E. en M. KOSTELNIK. 1965. The effect of ouabain on the hydration and the adenosinetriphosphatase activity of the cornea. J. Pharmacol. Exp. Ther., 150 398.
- LATARJET, R. en L. R. CALDAS. 1952. Restoration induced by catalase in irradiated micro-organisms. J. Gen. Physiol., 35 455.
- LAZARUS, L. H. en O. H. SCHERBAUM. 1967. Some properties of the acid phosphatases of *Tetrahymena Pyriformis* Life Sciences, 6 2401.
- LESTER, G. 1958. Requirement for potassium by bacteria. J. Bact., 75 426.
- LIEBERMAN, E. M. 1967. Structural and functional sites of action of ultraviolet radiations in

- crab nerve fibers. III The photoinactivation of a Na^+ - K^+ -activated ATPase system and its correlation with inactivation of excitability. *Exp. Cell Res.*, 47, 518.
- LINNEWEAVER, H. en D. BURK. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658.
- LIPMANN, F. en L. C. TUTTLE. 1945. A specific micromethod for the determination of acyl-phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 159, 21.
- LOWE, A. G. 1968. Enzyme mechanism for the active transport of sodium and potassium ions in animal cells. *Nature*, 219, 934.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR en R. J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- LUBIN, M. 1964. Intracellular potassium and control of protein synthesis. *Fed. Proc.*, 23, 994.
- MAIZELS, M., M. REMINGTON en R. TRUSCOE. 1958. The effects of certain physical factors and of the cardiac glycosides on sodium transfer by mouse ascites tumour cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 140, 61.
- MARSH, C. en W. MILITZER. 1956. Thermal enzymes. VII Further data on an adenosinetriphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 60, 433.
- MASSEY, V. 1953. Studies on fumarase. 2. The effects of inorganic anions on fumarase activity. *Biochem. J.*, 53, 67.
- MASSEY, V., B. CURTI en H. GANTHER. 1966. A temperature-dependent conformational change in D-amino acid oxidase and its effect on catalysis. *J. Biol. Chem.*, 241, 2347.
- MUNOZ, E., J. H. FREER, D. J. ELLAR en M. R. J. SALTON. 1968. Membrane-associated ATPase activity from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 531.
- MYRBACK, K. 1926. Über Verbindungen einiger Enzyme mit inaktivierenden Stoffen. II. *Z. Physiol. Chem.*, 159, 1.
- NAGAI, K., F. IZUMI en H. YOSHIDA. 1966. Studies on potassium dependent phosphatase; Its distribution and properties. *J. Biochem. (Tokyo)*, 59, 295.
- NAGANO, K., T. KANAZAWA, N. MIZUNO, Y. TASHIMA, T. NAKAO en M. NAKAO. 1965. Some acyl phosphate-like properties of P^{32} labeled sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 759.
- NEU, H. C. en L. A. HEPPEL. 1964. On the surface localization of enzymes in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 215.
- NEU, H. C. en L. A. HEPPEL. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*, 240, 3685.
- NEUJAHN, H. Y., E. HANSSON en R. FERM. 1967. Transport of B-vitamins in micro-organisms. VIII Comparative studies on membrane bound ATPase(s) obtained from normal and niacin deficient cells of *S. faecalis*. *Acta Chem. Scand.*, 21, 182.
- NEUMANN, J. en N. GRUENER. 1967. A soluble ATP-ase from bean roots stimulated by monovalent cations. *Israel J. Chem.*, 5, 107.
- OLIVER, I. T. en J. L. PEEL. 1956. Myokinase activity in microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 390.
- OPIT, L. J. en J. S. CHARNOCK. 1965. A molecular model for a sodium pump. *Nature*, 208, 471.
- OPIT, L. J., H. POTTER en J. S. CHARNOCK. 1966. The effect of anions on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 120, 159.
- ORLOF, J. en M. BURG. 1960. Effect of strophanthidin on electrolyte excretion in the chicken. *Amer. J. Physiol.*, 199, 49.
- PORTIUS, H. J. en K. R. H. REPKF. 1967. Eigenschaften und Funktion des $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten, Mg^{++} -abhängigen Adenosintri-phosphat Phosphohydrolase-systems des Herzmuskels. *Acta biol. med. german.*, 19, 907.
- POST, R. L. 1959. Relationship of an ATPase in human erythrocyte membranes to the active transport of sodium and potassium. *Fed. Proc.*, 18, 121.

- POST, R. L., C. R. MERRITT, C. R. KINSOLVING en C. D. ALBRIGHT. 1960. Membrane adenosine-triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 235 1796
- POST, R. L., A. K. SEN en A. S. ROSENTHAL. 1965 A phosphorylated intermediate in adenosine-triphosphate dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *J. Biol. Chem.*, 240. 1437.
- REPASKE, R. 1956. Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 22 189.
- RIDDERSTAP, A. S. en S. L. BONTING. 1968. Studies on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated adenosinetriphosphatase. XXII $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated adenosinetriphosphatase and pancreatic secretion in the dog. *Amer. J. Physiol.*, ter perse.
- ROBERTS, R.B., I. Z. ROBERTS en D. B. COWIE. 1949. Potassium metabolism in *Escherichia coli*. II Metabolism in the presence of carbohydrates and their metabolic derivatives. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 34 259.
- ROGERS, D. en F. J. REITHEL. 1960. Acid phosphatases of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 89 97.
- ROSENBERG, I. H. en L. E. ROSENBERG. 1968. Localization and characterization of adenosinetriphosphatase in guinea pig intestinal epithelium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24 975.
- ROSSUM, G. D. V. VAN. 1964 The effect of oligomycin on net movements of sodium and potassium in mammalian cells *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, 82 556.
- ROTTEM, S. en S. RAZIN. 1966. Adenosinetriphosphatase activity of mycoplasma membranes. *J. Bact.*, 92 714.
- SACHS, G., J. D. ROSE en B. I. HIRSCHOWITZ. 1967 Acetyl phosphatase in brain microsomes: A partial reaction of $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 119 277
- SCHATZMANN, H. J. 1953. Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. *Helv. Physiol. Acta*, 11 346.
- SCHÖN, R. en K. H. MENKE. 1967. Isolierung und enzymatische Eigenschaften der Zellmembran von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. *Acta biol. med. german.*, 18 43.
- SCHONER, W., R. KRAMER en W. SEUBERT. 1966. On the role of phosphorylated intermediates in sodium and potassium stimulated ATP-hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 403.
- SCHULTZ, S. G., W. EPSTEIN en D. A. GOLDSTEIN. 1962. Cation transport in *Escherichia coli*. III Potassium fluxes in the steady-state. *J. Gen. Physiol.* 46 343.
- SCHULTZ, S. G., W. EPSTEIN en A. K. SOLOMON. 1963. Cation transport in *Escherichia coli*. IV Kinetics of net K uptake. *J. Gen. Physiol.*, 47 329.
- SCHULTZ, S. G. en A. K. SOLOMON. 1961. Cation transport in *Escherichia coli*. I Intracellular Na and K concentrations and net cation movement. *J. Gen. Physiol.*, 45 355.
- SEN, A. K. en R. L. POST. 1964. Stoichiometry and localization of adenosinetriphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 239. 345.
- SHAW, T. I. 1954, Ph. D. Thesis Cambridge University.
- SIMON, K. A. en S. L. BONTING. 1962. Possible usefulness of cardiac glycosides in treatment of glaucoma. *Arch. Ophthalm. (Chic.)*, 68 227.
- SKOU, J. C. 1957. The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, 23. 394.
- SKOU, J. C. 1960. Further investigations on a $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+$ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 42 6.
- SKOU, J. C. en C. HILBERG. 1965. The effect of sulphhydryl-blocking reagents and of urea on the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated enzyme system. *Biochim. Biophys. Acta*, 110 359.
- SLAYMAN, C. L. en C. W. SLAYMAN. 1968. Net uptake of potassium in *Neurospora*. Exchange for sodium and hydrogen ions. *J. Gen. Physiol.*, 52. 424.

- SLAYMAN, C. W. en E. L. TATUM. 1965. Potassium transport in *Neurospora*. II Measurement of steady-state potassium fluxes. *Biochim. Biophys. Acta*, 102: 149.
- SOKAWA, Y. 1965. Liberation of inorganic phosphate from ATP and GTP by a protoplast membrane fraction of *Streptococcus pyogenes*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 57: 706.
- SOLOMON, A. K. 1962. Ion transport in single cell populations. *Biophys. J.*, 2¹¹: 79.
- STADTMAN, E. R. 1952. The purification and properties of phosphotransacetylase. *J. Biol. Chem.*, 196: 527.
- STONE, A. J. 1968. A proposed model for the Na⁺ pump. *Biochim. Biophys. Acta*, 150: 578.
- SWANSON, P. D. en H. MCILWAIN. 1965. Inhibition of the sodium-ion-stimulated adenosine-triphosphatase after treatment of isolated guinea pig cerebral cortex with ouabain and other agents. *J. Neurochem.*, 12: 877.
- TASHIMA, Y., T. NAKAO, K. NAGANO, N. MIZUNO en M. NAKAO. 1966. Partial purification and characterization of sodium- and potassium-dependent adenosinetriphosphatase from rat-heart muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 117: 54.
- TIETZ, A. en S. OCHOA. 1958. „Fluorokinase“ and pyruvic kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 78: 477.
- TORRIANI, A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 38: 460.
- TOSTESON, D. C. 1963. Active transport, genetics and cellular evolution. *Fed. Proc.*, 22: 19.
- TOSTESON, D. C., R. H. MOULTON en M. BLAUSTEIN. 1960. An enzymatic basis for the difference in active cation transport in two genetic types of sheep red cells. *Fed. Proc.*, 19: 128.
- VATES, T. S. JR., S. L. BONTING en W. W. OPPELT. 1964. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. IX Na-K activated adenosinetriphosphatase and formation of cerebrospinal fluid in the cat. *Amer. J. Physiol.*, 206: 1165.
- WEBB, E. C. en P. F. W. MORROW. 1959. The activation of an arylsulphatase from ox liver by chloride and other anions. *Biochem. J.*, 73: 7.
- WEIBULL, C., J. W. GREENAWALT en H. LÖW. 1962. The hydrolysis of adenosinetriphosphate by cell fractions of *Bacillus megaterium*. I Localization and general characteristics of the enzymic activities. *J. Biol. Chem.*, 237: 847.
- WESSELS, J. S. C. en H. BALTSCHIEFFSKY. 1960. Adenosinetriphosphatase activity in chloroplasts. *Acta Chem. Scand.*, 14: 233.
- WEST, K. R. en M. G. PITMAN. 1967. Rubidium as a tracer for potassium in the marine algae *Ulva lactuca* L. and *Chaetomorpha darwinii* (Hooker) Kuetzing. *Nature*, 214: 1262.
- WHITTAM, R. 1958. Potassium movements and ATP in human red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 140: 479.
- WHITTAM, R. 1962. The asymmetrical stimulation of a membrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.*, 84: 110.
- WHITTAM, R. en M. E. AGER. 1965. The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes. *Biochem. J.*, 97: 214.
- WHITTAM, R. en R. E. DAVIES. 1953. Active transport of water, sodium, potassium and α -oxoglutarate by kidney-cortex slices. *Biochem. J.*, 55: 880.
- WHITTAM, R. en K. P. WHEELER. 1961. The sensitivity of a kidney ATPase to ouabain and to sodium and potassium. *Biochim. Biophys. Acta*, 51: 622.
- YOSHIDA, H., F. IZUMI en K. NAGAI. 1966. Carbamylphosphate, a preferential substrate of K⁺-dependent phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 120: 183.
- YOSHIDA, H., T. NAKADA en H. FUJISAWA. 1961. Effect of ouabain on ion transport and metabolic turnover of phospholipid of brain slices. *Biochim. Biophys. Acta*, 48: 614.
- ZARLENGO, M. H. en S. G. SCHULTZ. 1966. Cation transport and metabolism in *Streptococcus faecalis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 126: 308.

STELLINGEN

I

De onderzoeken van Bownds en van Akhtar en medewerkers maken het niet mogelijk conclusies te trekken over de bindingsplaats van retinaldehyde in rhodopsine.

Bownds D., *Nature*, **216**, 1178 (1967).

Akhtar M., P. T. Blossie en P. B. Dewhurst, *Chem. Commun.*, 631 (1967).

II

De gegevens over de basensamenstelling van RNA verkregen na korte incubatie ("pulse labeling") met radioactief fosffaat dienen met reserve geïnterpreteerd te worden.

Hartlief R., *Proefschrift*, Utrecht, 1968.

III

Het product van de eerste dissociatieconstante van een organisch zuur en de eerste stabiliteitsconstante van het zuur met Mn^{2+} of Fe^{2+} is veelal constant.

IV

Het pH-snelheidsprofiel voor de hydrolyse van N-p-chloorbenzylideenaniline zoals gegeven door Cordes en Jencks is aan kritiek onderhevig.

Cordes E. H. en W. P. Jencks, *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 832 (1962).

Reeves R. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 3332 (1962).

V

Volgens Leggett kan de opname van anorganisch fosffaat in gist via drie systemen plaats vinden met ieder een verschillende affiniteit voor fosffaat. Eén daarvan zou gekoppeld zijn aan de oxidatieve phosphorylering. De gronden, die hij hiervoor aanvoert, zijn echter onvoldoende.

Leggett J. E., *Plant Physiol.*, **36**, 277 (1961).

VI

Het door Perry beschreven syndroom is waarschijnlijk niet juist geassocieerd.

Perry T. L., S. Hansen, B. Fischler, R. Bunting en K. Berry, *New Engl. J. Med.*, **277**, 1219 (1967).

Perry T. L., S. Hansen en D. L. Love, *Lancet* I, 1229 (1968).

VII

Bij het toedienen van anti-lymphocyten serum dient met een afbraak van een mogelijk bestaande premunitie rekening te worden gehouden.

Sargent E., *Indian J. Malariology*, **8**, 333 (1954).

VIII

Er zijn aanwijzingen, dat er een verband bestaat tussen atopie en ulerythema ophryogenes.

Mertens R. L. J., *Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde*, **112**, 973 (1968).

Mertens R. L. J., *Arch. Derm.*, **97**, 662 (1968).

IX

Bij het katechetisch onderwijs op de katholieke opleidingsscholen voor onderwijzers doet zich de bijzondere moeilijkheid voor, dat zowel de persoonlijke geloofsontplooiing van de leerling als zijn latere functie van katechete op het katholieke basisonderwijs in het oog moet worden gehouden.

X

Een verkorting van de studieduur voor het doctoraalexamen zoals voorgesteld door Posthumus leidt in de faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen onherroepelijk tot een niveauverlaging.

Posthumus K., *De Universiteit: doelstellingen, functies, structuren*. 1968.

